

Thèse

Pour le

Doctorat de géochimie et écotoxicologie

De l'Ecole Doctorale Sciences et Environnement

Université Bordeaux 1

Par

Nicolas ORIEUX

Quantification et prévalence de *Flavobacterium psychrophilum* chez les truites arc-en-ciel d'aquaculture ;  
relation hôte-pathogène et réponse immunitaire.

Membres du jury

M. GARABETIAN Frédéric, PR, Université Bordeaux 1	Président
Mme MICHOTHEY Valérie, PR, Université de la Méditerranée, Aix-Marseille 2	Rapporteur
M. BUSTAMANTE Paco, PR, Université de La Rochelle	Rapporteur
M. VELOT Christian, MC-HDR, Université Paris-sud 11	Examinateur
Mme CALVEZ Ségolène, MC, ONIRIS Nantes	Invitée
M. BOURDINEAUD Jean-Paul, PR, Université Bordeaux 1	Co-directeur
M. LE HENAFF Michel, MC-HDR, Université Bordeaux 1	Co-directeur





*“La fortune sourit aux audacieux.”*

Virgile



## Remerciements

Cette thèse est un moment très important de ma vie, d'une part, parce qu'elle est un aboutissement de mon cursus universitaire et d'autre part parce que c'est un rêve d'enfant qui se réalise. Bien entendu, je n'ai pas fait ce travail seul et à ce titre je voudrais remercier en espérant que je n'oublierai personne tous ceux qui y ont contribué.

Je souhaite tout d'abord remercier Messieurs Philippe Bertrand et Antoine Grémarre, les deux directeurs successifs de l'UMR EPOC, pour m'avoir accueilli dans leur unité de recherche et Messieurs Jean Magnes et Olivier Lavialle, les deux directeurs successifs de l'ENITA de Bordeaux pour m'avoir accueilli dans leur école.

Je voudrais à ce titre remercier le personnel de l'ENITA, Sandrine en particulier qui est d'une efficacité hors pair dans l'organisation du laboratoire, Valérie, Mylène, Annie, Murielle, Cathy, Patric, Charlotte et aussi Michelle, Pascale et Micheline. Je remercie aussi les nouveaux arrivants, Simon, Alexandra et Cécile qui m'ont aidé lors des répétitions de mon oral.

Et puis bien sûr Michel Le Hénaff, grâce à toi j'ai découvert de nouvelles techniques qui m'ont façonnés un profil pluridisciplinaire et donc valorisant, j'ai pu faire des heures d'enseignement, ce qui fut une expérience enrichissante, je te remercie pour tous nos échanges et te souhaite une bonne continuation sur ta thématique de recherche.

Je souhaite adresser un grand merci aux pisciculteurs d'aquitaine représentés par Diane Gaëlle Douet et Patrick Daniel respectivement du GDSAA et du LD40 sans qui tout mon travail sur le terrain n'aurait pu être réalisé. Cela apporte une plus-value incontestable à ma thèse.

J'adresse un grand merci à Jean Charles Massabuau, directeur charismatique du laboratoire GEMA d'Arcachon. Avec lui, j'associe les enseignants et chercheurs d'Arcachon, Patrice, Magalie, Damien, Agnès, Régine, Gilles avec qui j'ai pu échanger au cours de ce travail. Merci aussi au personnel de la station marine et particulièrement à Florence, qui est un petit peu notre maman à tous dans les moments difficiles. Et sans oublier Bruno, animalier de sa fonction qui me fut d'une aide précieuse pour mes installations expérimentales et mes sorties chez les pisciculteurs.



Bien entendu, je remercie mes camarades de thèse, Sébastien, Mohamedou, Adeline, Audrey, Ika, Amina, Dahlia et bien sur Sophie qui partageait mon bureau et donc ma bonne (souvent) et ma mauvaise (parfois) humeur.

Et enfin, Comment peut-on l'oublier, il est inoubliable, irremplaçable, inimitable ! Et oui, Jean-Paul Bourdineaud, tu as fais avec moi, comme avec tous tes autres étudiants, plus que ton travail d'enseignant chercheur. En effet, tu sais nous allumer, nous entretenir, nous réanimer la flamme qui nourrit notre curiosité et notre soif de connaissance. A chacune de nos conversations, qu'elles soient scientifiques ou autres et que je sois ou non d'accord avec toi, je m'en suis senti grandi. Pour cela je t'adresse mes plus chaleureux remerciements.



## **Publications et communications orales**

### **Publications**

**Analysis of the *Flavobacterium psychrophilum* outer-membrane subproteome and identification of new antigenic targets for vaccine by immunomics.** Dumetz F., Duchaud E., Claverol S., Orieux N., Papillon S., Lapaillerie D., Le Hénaff M. *Microbiology*. 2008 Jun; **154**: 1793-1801.

**Genotoxic damages in zebrafish submitted to a polymetallic gradient displayed by the Lot River (France).** Orieux N., Cambier S., Gonzalez P., Morin B., Adam C., Garnier-Laplace J. and Bourdineaud J. P. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2011 May; **74**(4):974-83.

**Quantification of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) samples by qPCR.** Orieux N., Douet D. G., Daniel P., Bourdineaud J. P. and Le Henaff M. 2010. *Journal of Fish Diseases*. Sous presse.

**Prevalence of *Flavobacterium psychrophilum* bacterial cells in farmed rainbow trout: characterization of metallothionein A and interleukine1- $\beta$  genes as biomarkers overexpressed in spleen and kidney of diseased fish.** Orieux N., Douet D. G., Le Henaff M. and Bourdineaud J. P. 2010. En cours de rédaction.

### **Communication**

**COST 867 Fish Welfare, Cracovie (Pologne). 14 – 17 avril 2008.** Orieux N., Dumetz F., Papillon S., Claverol S., Bourdineaud J. P. and Le Hénaff M. Présentation d'un poster: « Analysis of the *Flavobacterium psychrophilum* outer membrane for iron acquisition/metabolism studies and vaccination perspectives. »

**COST 867 Fish Welfare, Isafjordür (Islande). 15 – 17 juin 2009.** Orieux N., Bourdineaud J. P. and Le Hénaff M. Présentation orale: « Oral vaccination as a prophylaxis of fish diseases respecting welfare and environment. »

**Favobacterium 2009, Paris (France). 21 - 23 septembre 2009.** Orieux N., Daniel P., Douet D.-G., Bourdineaud J.-P. and Le Hénaff M. Présentation orale: « Accurate real-time PCR strategy for monitoring *Flavobacterium psychrophilum* loads in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). »



# Table des matières

<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>1. Synthèse bibliographique</b>	<b>4</b>
<b>1.1. Contexte</b>	<b>5</b>
<b>1.1.1. L'aquaculture en France et dans le monde</b>	<b>5</b>
<b>1.1.2. L'enjeu de la maîtrise des pathologies</b>	<b>7</b>
<b>1.1.3. L'approche hôte-pathogène-environnement</b>	<b>8</b>
<b>1.2. Le pathogène: <i>Flavobacterium psychrophilum</i></b>	<b>9</b>
<b>1.2.1. Classification des flavobactéries : taxonomie et phylogénie</b>	<b>9</b>
<b>1.2.2. Habitats</b>	<b>10</b>
<b>1.2.3. Historique</b>	<b>10</b>
<b>1.2.4. Caractéristiques morphologiques et physiologiques</b>	<b>11</b>
<b>1.2.5. Épidémiologie</b>	<b>12</b>
<b>1.3. L'hôte: <i>Oncorhynchus mykiss</i></b>	<b>14</b>
<b>1.3.1. Taxonomie, phylogénie et habitats</b>	<b>14</b>
<b>1.3.2. Morphologie générale</b>	<b>14</b>
<b>1.3.3. Le système immunitaire de la truite arc en ciel</b>	<b>15</b>
<b>1.4. La relation hôte-pathogène</b>	<b>16</b>
<b>1.4.1. Définitions</b>	<b>16</b>
<b>1.4.2. Perturbations de la relation hôte-pathogène</b>	<b>17</b>
<b>1.4.3. Impact de l'environnement aquatique sur la relation hôte-pathogène</b>	<b>17</b>
<b>1.5. Stratégie de l'étude</b>	<b>19</b>
<b>2. Matériel et méthode général</b>	<b>21</b>
<b>2.1. Matériels biologiques</b>	<b>22</b>
<b>2.1.1. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> : souches et conditions de culture</b>	<b>22</b>
<b>2.1.2. <i>Escherichia coli</i> : souches et conditions de culture</b>	<b>22</b>
<b>2.1.3. Autres bactéries types ou pathogènes de poissons</b>	<b>23</b>
<b>2.1.4. Truites arc-en-ciel</b>	<b>23</b>
<b>2.1.5. Poissons zèbre</b>	<b>23</b>



<b>2.2. Techniques préparatoires</b>	<b>24</b>
<b>2.2.1. Préparation des différentes fractions de <i>F. psychrophilum</i></b>	<b>24</b>
<b>2.2.2. Purification de l'ADN génomique de <i>F. psychrophilum</i></b>	<b>25</b>
<b>2.2.3. Préparation de l'ADN total de poisson</b>	<b>25</b>
<b>2.2.4. Extraction des ARN totaux et synthèse des ADNc</b>	<b>26</b>
<b>2.2.5. Purification de l'ADN plasmidique d'<i>E. coli</i></b>	<b>27</b>
<b>2.2.6. Amplification de l'ADN par PCR</b>	<b>27</b>
<b>2.2.7. Insertion des fragments d'ADN amplifiés par PCR dans le plasmide pGEMT-Easy</b>	<b>28</b>
<b>2.2.8. Synthèse de nanoparticules organiques</b>	<b>28</b>
<b>2.3. Techniques analytiques</b>	<b>29</b>
<b>2.3.1. Dosage des métaux dans l'eau</b>	<b>29</b>
<b>2.3.2. PCR en temps réel</b>	<b>30</b>
<b>2.3.3. Test comète</b>	<b>32</b>
<b>2.3.4. Dosage des protéines</b>	<b>33</b>
<b>2.3.5. Electrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE)</b>	<b>33</b>
<b>2.3.6. Electrophorèse bidimensionnelle</b>	<b>33</b>
<b>2.3.7. Révélation des protéines</b>	<b>34</b>
<b>2.3.8. Détection des protéines par immunoempreinte</b>	<b>35</b>
<b>2.3.9. Dosages des anticorps anti-<i>F. psychrophilum</i></b>	<b>36</b>
<b>2.3.10. Séquençage protéique</b>	<b>37</b>
<b>2.3.11. Analyse par RMN du proton</b>	<b>37</b>
<b>2.3.12. Microscopie électronique</b>	<b>38</b>
<b>2.4. Expression des résultats et analyses statistiques</b>	<b>38</b>
<b>3. Détection de <i>Flavobacterium psychrophilum</i></b>	<b>39</b>
<b>3.1. Introduction</b>	<b>40</b>
<b>3.2. Résultats et Discussion</b>	<b>41</b>
<b>Article</b>	<b>44</b>
<b>4. Approche écotoxicologique de la relation hôte-pathogène</b>	<b>56</b>
<b>4.1. Sensibilité de <i>F. psychrophilum</i> au cadmium</b>	<b>57</b>
<b>4.1.1. Tests préliminaires de croissance</b>	<b>57</b>
<b>4.1.2. Impact du cadmium sur la croissance</b>	<b>57</b>



<b>4.2. Impact du cadmium sur la relation hôte-pathogène</b>	<b>59</b>
<b>4.2.1. Introduction</b>	<b>59</b>
<b>4.2.2. Matériel et méthode spécifiques</b>	<b>60</b>
<b>4.2.3. Résultats</b>	<b>61</b>
<b>4.2.4. Discussion</b>	<b>63</b>
<b>4.3. Travail sur un site contaminé et un poisson modèle</b>	<b>65</b>
<b>4.3.1. Introduction</b>	<b>65</b>
<b>4.3.2. Résultats et discussion</b>	<b>66</b>
<b>Article</b>	<b>68</b>
<b>4.4. Etude de terrain de la relation hôte-pathogène</b>	<b>69</b>
<b>4.4.1. Introduction</b>	<b>69</b>
<b>4.4.2. Résultats et discussion</b>	<b>70</b>
<b>Article</b>	<b>73</b>
<b>5. Travail préliminaire sur les mesures prophylactiques</b>	<b>86</b>
<b>5.1. Recherche de déterminants antigéniques dans la membrane externe da la bactérie</b>	<b>87</b>
<b>5.1.1. Introduction</b>	<b>87</b>
<b>5.1.2. Résultats &amp; Discussion</b>	<b>88</b>
<b>Article</b>	<b>95</b>
<b>5.2. Approche de la vaccination orale, synthèse de nano-encapsulations organiques</b>	<b>96</b>
<b>5.2.1. Introduction</b>	<b>96</b>
<b>5.2.2. Résultats</b>	<b>97</b>
<b>5.2.3. Perspectives</b>	<b>97</b>
<b>6. Conclusion générale et perspectives de la thèse</b>	<b>99</b>
<b>7. Bibliographie</b>	<b>105</b>



# **Introduction générale**



La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) est un salmonidé d'eau douce importé au début du 20<sup>ème</sup> siècle en Europe depuis le Canada pour sa croissance rapide et ses grandes capacités d'adaptation aux conditions d'élevage. Ce poisson est aujourd'hui le produit essentiel de l'aquaculture dulçaquicole française avec une production de 32 000 tonnes par an pour un chiffre d'affaire d'environ 100 millions d'euros. Ces vingt dernières années, l'augmentation de la production et une demande croissante ont nécessité des techniques de production plus industrielles pour être plus rentables. L'intensification de l'aquaculture s'est accompagnée d'un développement de différentes pathologies. Elles peuvent être non-infectieuses, liées aux conditions environnementales, nutritionnelles et génétiques de l'élevage, ou infectieuses, liées au développement de pathogènes opportunistes. La densité et le confinement des poissons ont conduit à l'émergence de bio-agresseurs "élevés" en même temps que les poissons. Il est possible d'observer les effets de ces bio-agresseurs seuls ou en associations. Il existe 3 catégories : les parasites, les virus, les bactéries. D'un point de vue économique, il est nécessaire de limiter l'incidence de ces bio-agresseurs pour que l'élevage soit économiquement rentable. En effet, les coûts liés aux pathologies infectieuses sont considérables dans l'industrie aquacole.

De nombreuses bactéries ichtyopathogènes ont été décrites (*Yersinia ruckeri*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Renibacterium salmoninarum*, ...) parmi lesquelles *Flavobacterium psychrophilum*. Cette bactérie à coloration de Gram négative retrouvée chez de nombreux poissons d'eau douce sauvages ou d'élevage est l'agent responsable de la flavobactériose d'eau froide apparaissant sous deux formes, le syndrome de l'alevin de truite arc-en-ciel ou RTFS (pour "Rainbow Trout Fry Syndrom") d'une part, et la maladie bactérienne de l'eau froide ou BCWD (pour "Bacterial Cold Water Disease") d'autre part. Décrise pour la première fois en 1946 aux Etats-Unis, la flavobactériose d'eau froide n'est apparue en France qu'au milieu des années 1980. Les pertes économiques induites dans les élevages aquacoles de truites sont considérables dans la mesure où l'infection peut conduire à 70 % de mortalité des poissons au stade alevin. Les mécanismes de virulence liés à cette bactérie ainsi que les modalités de la relation hôte-pathogène truite-*F. psychrophilum* sont méconnus. En effet, nous ignorons s'il s'agit d'une bactérie développant la maladie immédiatement après l'infection, d'une commensale profitant de faiblesses du système immunitaire de l'hôte, ou d'un pathogène chronique "usant" ce système immunitaire jusqu'à le dépasser. Le type de relation hôte-pathogène est très important à déterminer car c'est de lui que découle l'établissement de mesures prophylactiques.

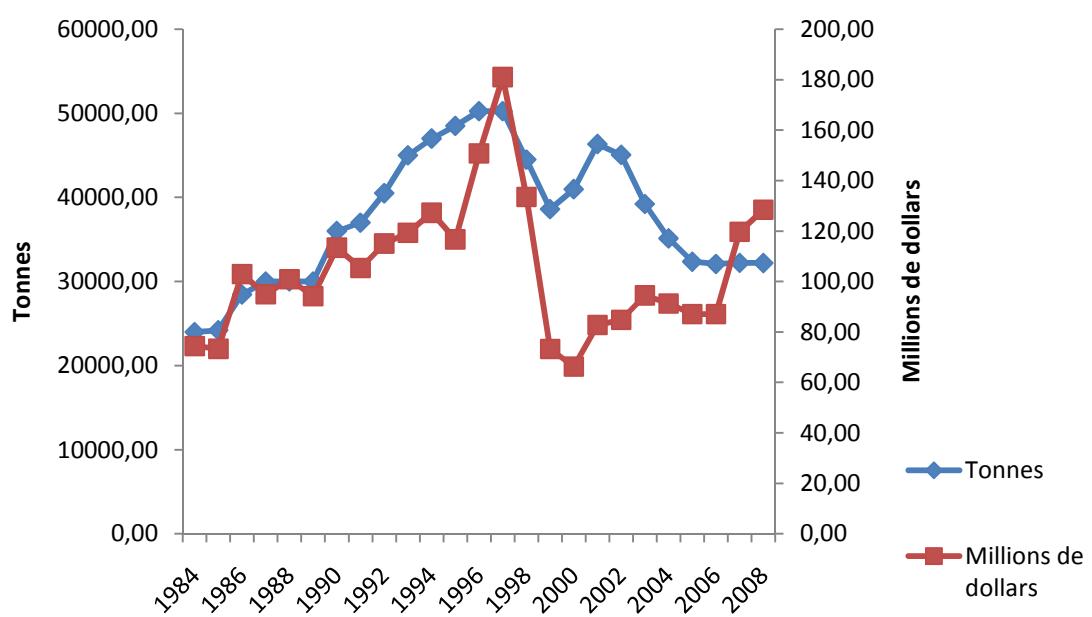


C'est dans l'optique de préciser les modalités de cette relation hôte-pathogène que nous avons initié ce travail. Le premier et le deuxième chapitre présentent une synthèse bibliographique et les matériels et méthodes utilisés au cours de cette étude. Le troisième chapitre est consacré à la mise au point d'une technique permettant de détecter et quantifier la flavobactérie dans l'eau et les matrices biologiques afin de déterminer la prévalence du pathogène dans l'écosystème aquacole. Le quatrième chapitre traite de l'application de cette technique en pisciculture, à laquelle s'ajoute l'analyse de la réponse immunitaire du poisson, au travers d'une étude comparative de 7 piscicultures d'Aquitaine dans lesquelles ont été prélevés des animaux malades et apparemment sains de caractéristiques variées (taille, poids, température d'élevages, traitements d'antibiotiques subis ...). Il est aussi abordé l'impact d'un métal trace, le cadmium, sur la relation hôte-pathogène simulée en laboratoire. Nous présenterons également une étude traitant de l'impact d'eau de rivière, contaminée par le cadmium et le zinc, en terme de bioaccumulation des métaux, de génotoxicité, et d'expression de gènes de réponse au stress sur un poisson modèle : le poisson zèbre *Danio rerio*.

En raison des contraintes législatives et écologiques qui limitent l'utilisation massive des antibiotiques, la lutte contre la flavobactériose repose sur la mise au point de méthodes précoces de détection/identification de l'agent pathogène et aussi de mise au point d'un vaccin. La recherche de déterminants antigéniques chez *F. psychrophilum* potentiellement utilisables dans un "cocktail" vaccinant ainsi que d'un vecteur d'administration d'un tel vaccin sont présentés dans le cinquième chapitre.



## **1. Synthèse bibliographique**



**Fig. 1.** Production française annuelle de truite arc-en-ciel en tonnes et en millions de dollars

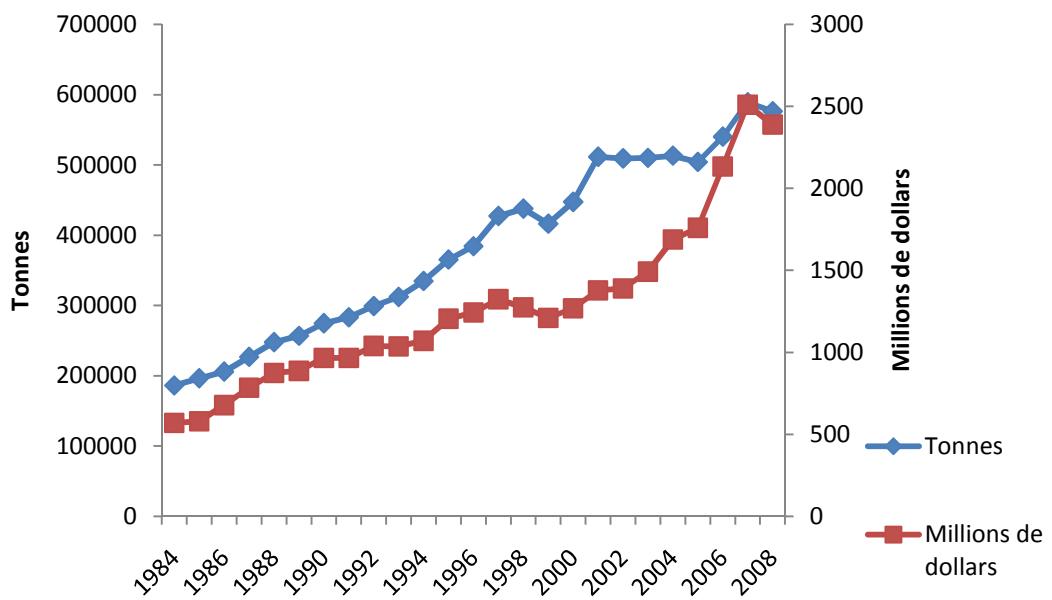
## 1.1. Contexte

### 1.1.1. L'aquaculture en France et dans le monde

Le terme aquaculture est défini, selon la FAO par : « Elevage d'organismes aquatiques (poissons, mollusques, crustacés, plantes aquatiques...) avec pour conditions d'une part une intervention humaine dans le processus d'augmentation de la production et d'autre part une propriété industrielle ou juridique du stock en élevage. »

En 2005, la production aquacole française en métropole était de 240 000 tonnes, dont 189 300 tonnes de coquillages et 50 700 tonnes de poissons et crustacés (quelques tonnes pour ces derniers élevés en anciens marais atlantiques). Il faut ajouter à ces chiffres, environ 500 tonnes produites dans les régions et collectivités d'outre-mer dont plus de 450 tonnes de poissons et 20 tonnes de crustacés. Cette production représente une valeur à la vente initiale de 533 millions d'euros en métropole. Ces chiffres sont à comparer à ceux de la pêche qui représente en métropole une vente de 1 102 millions d'euros, pour un apport de 568 700 tonnes. La production aquacole française connaît une stagnation voire une régression depuis une quinzaine d'années (Tanguy 2008). La production de truite arc-en-ciel était de 32 200 tonnes en 2008 pour un chiffre d'affaire, en sortie d'élevage, de 128 millions de dollars (FAO 2008). Le niveau de production stagne depuis 2004 mais il est intéressant de noter que la valeur de la chair augmente passant de 1,62 \$/kg en 2000 à 3,99 \$/kg en 2008 (**Fig. 1**). La pisciculture représente 430 entreprises allant de quelques tonnes à plus de 4 000 tonnes / an en production. La France est au cinquième rang mondial de production de truite arc-en-ciel derrière le Chili, la Norvège, l'Iran et l'Italie. Les entreprises françaises occupent une place importante dans l'exportation d'œufs de truite et d'alevins : la France est devenue le premier exportateur d'œufs de truite en Europe (le groupe Aqualande est le premier producteur d'œufs de truite au monde avec 400 millions d'œufs embryonnés produits par an et tient 50 % du marché européen). Les deux régions principales productrices de truite arc-en-ciel sont l'Aquitaine et la Bretagne.

L'aquaculture mondiale a connu une progression constante des productions qui sont passées de 2 milliards de tonnes en 1960 à 63 milliards de tonnes en 2005, soit 40 % des apports totaux en produits aquatiques. La valeur de ces apports est aujourd'hui supérieure à celle des produits de la pêche (prévisions 2010, FAO). Son taux d'accroissement est sans commune mesure avec les autres productions animales (+ 230 % de 1990 à 2004, contre 88 %



**Fig. 2.** Production mondiale annuelle de truite arc-en-ciel en tonnes et en millions de dollars

## 1. Synthèse bibliographique

pour la volaille, 44 % pour le porc, 26 % pour les ovins et 17 % pour les bovins). On assiste d'autre part à une diversification croissante des systèmes, des espèces et des produits, répondant à la demande de la consommation orientée vers plus de choix, plus de praticité, plus de sécurité sanitaire. L'aquaculture répond aussi aux demandes nouvelles des pays émergeants qui consomment de plus en plus de produits aquatiques (la Chine atteint près de 30 kg/hab./an contre 15 kg/hab./an dans les années 80). La production de truite arc-en-ciel était elle aussi en progression passant de 186 000 tonnes en 1984 à 589 000 tonnes en 2007 et tend à se stabiliser aujourd'hui autour de cette dernière valeur. Le prix de vente moyen en sortie d'élevage est lui aussi stable autour de 4,20 \$/kg (**Fig. 2**).

L'aquaculture mondiale connaît de nombreux problèmes liés à sa forte croissance, en particulier : l'accroissement des problèmes environnementaux ; le développement de maladies de moins en moins contrôlables ; le risque de banalisation des produits ; la concurrence de plus en plus forte des pays à faible coût de main d'œuvre ; une pression de plus en plus forte sur le prix des intrants. En effet, l'aquaculture est devenue la première activité consommatrice de farines et d'huiles de poissons.

Ces vingt dernières années, l'augmentation de la production et une demande croissante ont nécessité des techniques de production plus industrielles pour être plus rentables. Parallèlement, le commerce des œufs et des poissons d'élevage s'est internationalisé. Ces phénomènes ont contribué à l'apparition et à la dissémination de maladies et de problèmes pathologiques qui ont fortement perturbé la production. Les maladies diagnostiquées dans les élevages de poissons peuvent être non-infectieuses liées aux conditions environnementales, nutritionnelles, et génétiques. Elles peuvent également être infectieuses, dans la mesure où des pathogènes opportunistes peuvent se développer. Différents bio-agresseurs, seuls ou en association, peuvent affecter les poissons : parasites (*Gyrodactylus sp.*), virus (les rhabdovirus SHV et NHI, responsables respectivement de la « Septicémie Hémorragique Virale » ou de la « Nécrose Hématopoïétique Infectieuse ») et bactéries. En effet, de nombreuses bactéries ichtyopathogènes ont été décrites (*Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum*, *Yersinia ruckeri*, ...) parmi lesquelles *Flavobacterium psychrophilum*.



### 1.1.2. L'enjeu de la maîtrise des pathologies

Le risque sanitaire des pathologies des poissons d'élevage est lié au fait que l'élevage intensif révèle la présence des bio-agresseurs présents dans l'environnement aquatique et que ses bio-agresseurs sont "élevés" en même temps que les poissons. Il est donc essentiel de limiter l'incidence de ces bio-agresseurs pour que l'élevage soit rentable. En effet, le coût économique des pathologies infectieuses est considérable dans l'industrie aquacole. Il inclut bien sûr la mortalité des poissons mais également les pertes commerciales liées aux manifestations cliniques qui rendent les poissons survivants improches à la consommation ainsi que le coût des traitements curatifs mis en place pour lutter contre le pathogène. Les infections à *F. psychrophilum* peuvent causer des mortalités moyennes comprises entre 30 et 50 % des individus. Elles s'élèvent à 70 % dans le cas de certaines épizooties aiguës touchant les alevins au stade vésiculé pesant de 0,2 à 0,5 g. Au niveau mondial, les coûts induits par les pathologies sur les poissons d'élevage peuvent être évalués en centaines de millions d'euros annuels en raison des pertes d'exploitation et des dépenses liées aux traitements (hygiéniques et/ou antibiotiques). En 2004, l'impact financier lié à la flavobactériose a été estimé à 10 millions d'euros pour la région d'Aquitaine (Guichard 2004).

Tout au long des phases constituant l'élevage de la truite arc-en-ciel, des mesures prophylactiques sont mises en place pour lutter contre la flavobactériose. La désinfection des œufs et des alevins est couramment utilisée grâce à des substances antiseptiques comme l'iode actif (iodophores en bain à 0,5 %, 10 minutes), la chloramine T (en bain de 2 à 15 mg/L d'eau selon sa dureté, 30 minutes), les ammoniums quaternaires (en bain dilué à 2 mg/L), le peroxyde d'hydrogène (1 à 2 %, 30 minutes par jours) ou encore le glutaraldéhyde (500 mg/L, 30 minutes) (Ferra 2008). Lors du déclenchement d'un épisode infectieux, des antibiotiques peuvent être utilisés sous prescription vétérinaire, ils sont le plus souvent administrés dans la nourriture. En France, trois antibiotiques différents sont principalement utilisés : la fluméquine, l'oxytetracycline et l'acide oxolinique essentiellement contre les deux agents pathogènes *Yersinia ruckeri* et *Aeromonas salmonicida*. Le florfénicol qui fait l'objet d'une autorisation temporaire est principalement utilisé pour lutter contre *Flavobacterium psychrophilum* depuis les années 2000. Dans un souci de limiter l'utilisation de ces produits pour lesquels des résistances peuvent apparaître et dont l'impact sur l'environnement est non négligeable, de nombreuses recherches actuelles pour contrôler les flavobactérioses hivernales se focalisent sur des approches biotechnologiques (utilisation de bactériophages ou de



flavobactéries atténuées). Ces études préliminaires sont prometteuses pour produire des traitements à bas coûts, mais présentent des difficultés pour une application à court terme. Afin de prévenir les infections bactériennes, des vaccins sont utilisés notamment contre *Y. ruckeri*, *V. anguillarum* et *A. salmonicida*. Le vaccin doit présenter des qualités d'innocuité, d'efficacité, de durée et de coût. La vaccination peut être faite par balnéation (contact d'antigènes avec les cellules immunocompétentes des branchies) mais son efficacité est limitée, ou par injection intra-péritonéale qui implique d'injecter un par un les poissons d'un poids supérieur à 10 grammes et préalablement anesthésiés.

### 1.1.3. L'approche hôte-pathogène-environnement

La pollution environnementale aquatique par produits chimiques ou médicaments possède potentiellement des effets défavorables sur les capacités immunitaires des poissons. La plupart des tests immunotoxicologiques portent seulement sur un, ou sur un nombre limité de paramètres ou de fonctions, appelés "biomarqueurs" (Beaman *et al.* 1999). De plus, ils déterminent seulement la capacité complète du système immunitaire à réagir, mais échouent à examiner l'influence sur une réaction immunitaire spécifiquement stimulée (Zelikoff 1998). Les tests généralement utilisés déterminent la somme des facteurs humoraux non spécifiques (lysozyme, complément...) et spécifiques (production d'anticorps de type M, IgM) et certains tests couramment utilisés consistent à mesurer l'activité phagocytaire ou proliférative des cellules du système immunitaire.

L'environnement aquatique continental, fleuves, lacs et rivières, est contaminé par des polluants métalliques et organiques et affecté par des variations de tous ces éléments constitutifs (métaux essentiels, oxygène, ions ...). Ceux-ci ont nécessairement un impact délétère ou bénéfique sur la santé des organismes vivant dans ces biotopes. L'objectif de ce travail est d'étudier l'influence de certains de ces facteurs environnementaux sur les capacités immunitaires d'un poisson tel que la truite, susceptible d'être contaminée dans son habitat naturel ou en pisciculture par des flavobactéries d'origine microbienne. Parallèlement à l'étude de la perturbation de la résistance immunitaire, l'effet croisé des polluants et du pathogène sera abordé par l'analyse de la réponse génétique, de la physiologie mitochondriale, de l'impact génotoxique, et de la perturbation du métabolisme hépatique. Le but à long terme étant la proposition de mesures prophylactiques adaptées.



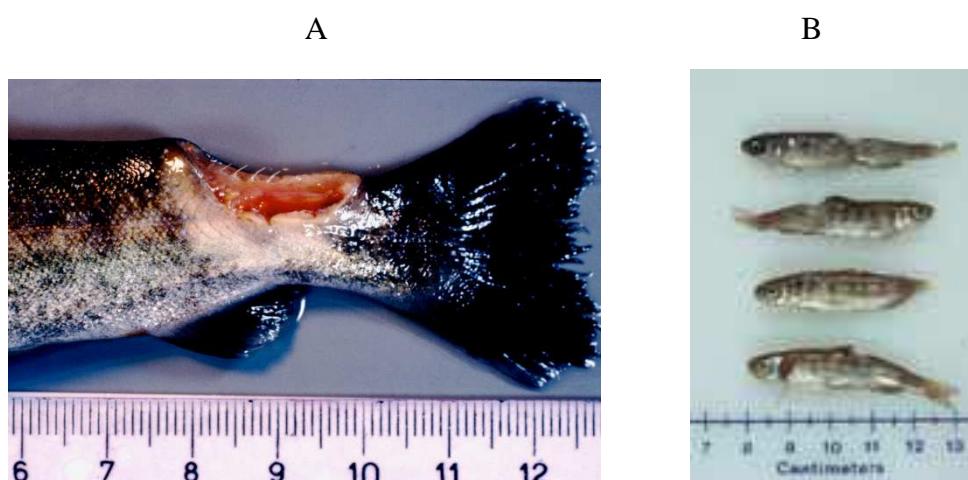
## 1.2. Le pathogène: *Flavobacterium psychrophilum*

Le genre *Flavobacterium* appartient à la famille des *Flavobacteriaceae* (de *flavus*: jaune) qui constitue une des principales lignées phylogénétiques au sein du domaine des *Bacteria* (Woese *et al.* 1985) (Bernardet *et al.* 1996). Historiquement, plusieurs noms ont été donnés à cette lignée, comme le phylum « *Flavobacter-Bacteroides* » (Ghera and Woese 1992), le complexe *Flavobacterium-Cytophaga* (Nakagawa and Yamasato 1993), la superfamille ARNr V (Segers *et al.* 1993) ou le groupe « *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* » ou groupe CFB (Hirsch *et al.* 1998). A l'origine, ce phylum était constitué des genres *Cytophaga*, *Flexibacter* et *Flavobacterium*. Des études de phylogénie à partir des séquences d'ARNr 23S ont suggéré que le phylum bactérien le plus proche du groupe CFB correspond aux bactéries vertes soufrées (Woese *et al.* 1990). Plus récemment, ce phylum a été renommé *Bacteroidetes* (Bernardet and Nakagawa 2003).

### 1.2.1. Classification des flavobactéries : taxonomie et phylogénie

Le genre *Flavobacterium* a été décrit pour la première fois en 1923 (Berkeley *et al.* 1923). Il était constitué de bactéries Gram-négatives aérobies qui se distinguaient par leur forme allongée en fin bâtonnet et par la présence d'un pigment jaune caractéristique de type flexirubine et/ou caroténoïde. Ces bactéries étaient incapables de sporuler et possédaient la propriété de ne pas être douées de mobilité par glissement, contrairement aux membres appartenant aux genres *Cytophaga* et *Flexibacter* (Holmes *et al.* 1984). Cette absence de mobilité propre aux flavobactéries au sein du groupe CFB suggérerait une évolution à partir d'ancêtres distincts (Reichenbach 1989) (Woese *et al.* 1990).

En raison du nombre restreint des critères d'appartenance au genre *Flavobacterium*, ce genre a rapidement rassemblé des espèces très peu caractérisées, et qui de ce fait est devenu très hétérogène. Une réorganisation des espèces au sein de la famille des *Flavobacteriaceae* et plus particulièrement du genre *Flavobacterium* s'imposait (Bernardet *et al.* 1996; Bernardet *et al.* 2002). En effet, l'espèce type *Flavobacterium aquatile* (Holmes 1992) était plus proche de certaines espèces de *Cytophaga* que des espèces de *Flavobacterium* elles-mêmes, dans la mesure où cette espèce est mobile par mouvements de glissement et que les observations réalisées par microscopie électronique ont montré que la structure de sa paroi est similaire à celle de *Cytophaga johnsoniae* (Follett and Webley 1965). La réorganisation du genre *Flavobacterium* n'a été possible qu'en s'appuyant à la fois sur des critères moléculaires



**Fig. 3.** Truites arc-en-ciel adulte (A) et juvéniles (B) présentant les signes cliniques de la flavobactérieose sous la forme du BCWD (A) et du RTFS (B).

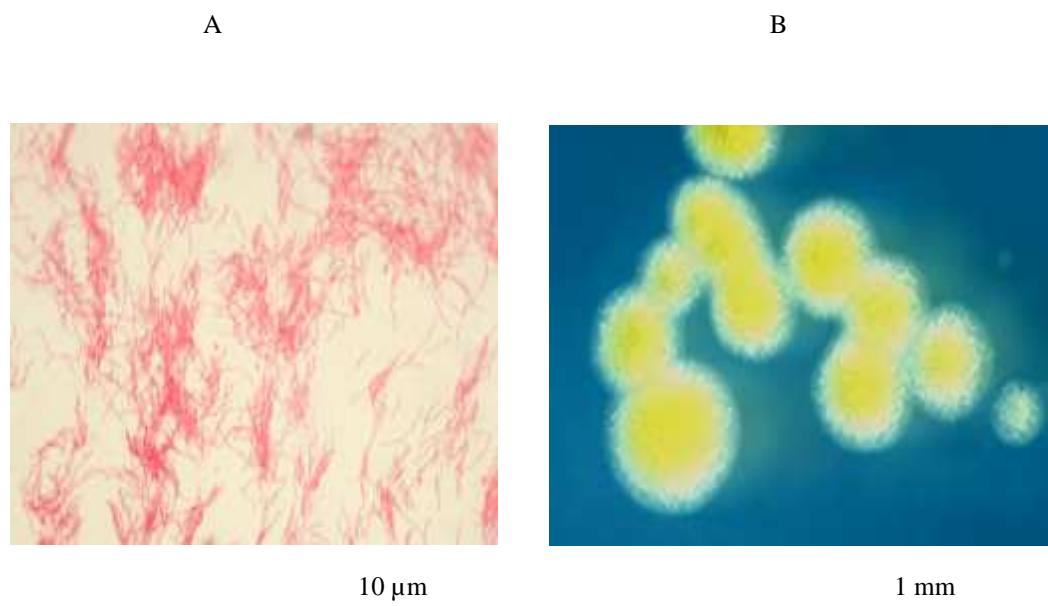
et phénotypiques. Désormais, les flavobactéries du genre *Flavobacterium* possèdent un certain nombre de caractéristiques communes. Il s'agit de bactéries Gram-négatives, de forme allongée, flexibles et qui présentent une motilité par mouvement de glissement à l'exception de *F. branchiophilum*. Cependant, il n'est pas exclu que cette espèce retrouve ce type de mobilité sous certaines conditions physiologiques encore non mises en évidence. Les flavobactéries sont dépourvues de flagelles et de *fimbriae*, et leurs colonies ont une couleur typiquement jaune (allant de la couleur crème à orange brillant). La température optimale de croissance oscille entre 20 et 30 °C, exceptée celle de *F. psychrophilum* qui est de 15 °C. Ces bactéries ont la capacité de dégrader les protéines (ex. gélatine ou caséine) mais également des composés polysaccharidiques comme l'amidon, la chitine ou la pectine. L'incapacité des bactéries du genre *Flavobacterium* à dégrader la cellulose est une des caractéristiques essentielles qui permet de les distinguer des *Cytophaga*, genre désormais restreint aux organismes cellulolytiques (Nakagawa and Yamasato 1996).

### 1.2.2. Habitats

Les flavobactéries ont été isolées à partir d'habitats très variés. Comme il s'agit de bactéries chimioorganotrophes, elles ont été retrouvées dans le sol et les eaux. Un certain nombre d'entre elles colonisent les poissons chez lesquels elles exercent un pouvoir pathogène. C'est le cas notamment de *F. branchiophilum*, *F. columnare*, *F. johnsoniae*, ou *F. psychrophilum*. D'autres comme *F. hydatis*, ou *F. succinicans*, ont été retrouvées et isolées à partir de poissons malades, sans pour autant que leur pathogénicité ait pu être mise en évidence (Bernardet *et al.* 1996).

### 1.2.3. Historique

En 1941 et 1945, deux importantes épizooties ont été déclarées dans une pisciculture de l'Institut National d'Alevinage à Leetown en Virginie occidentale (USA) où seules des truites arc-en-ciel étaient infectées. Les signes cliniques observés chez les poissons (< 4 mois) ont conduit à nommer cette infection "maladie du pédoncule" puisque les caractéristiques pathologiques étaient associées au pédoncule et à la nageoire caudale (Davis 1946) (**Fig. 3A**). Bien que l'agent étiologique responsable de cette maladie n'ait pas été isolé, de longs et fins bacilles regroupés en masse ont été observés au niveau des lésions externes des poissons infectés, ainsi qu'au niveau de la rate. A la suite de cette première infection, d'autres épizooties sont apparues en hiver chez plusieurs populations de saumons argentés



**Fig. 4.** *Flavobacterium psychrophilum*, souche JIP 02/86. Clichés d'une suspension bactérienne observée au microscope photonique après coloration de GRAM (A) ou de colonies se développant sur milieu AOAE observées à la loupe binoculaire (B).

(*Oncorhynchus kisutch*) vivant dans une eau dont la température était comprise entre 6 et 10 °C (Borg 1948, 1960). Malgré les faibles températures, les taux de mortalité observés chez les poissons étaient extrêmement élevés (jusqu'à 70 %). Au cours de ces infections, la pathologie et les caractéristiques morphologiques des bactéries associées aux lésions se trouvaient être identiques à celles décrites initialement chez la truite arc-en-ciel. La bactérie était mobile par glissement, propriété qu'elle partageait avec *Flavobacterium columnare*, l'agent étiologique responsable de la columnariose (Ordal and Rucker 1944). A partir des lésions décelées chez les saumons argentés, la bactérie a pu être cultivée puis réinoculée afin de reproduire la maladie. Compte-tenu de la propriété qu'a la bactérie à induire des épizooties à basse température, la maladie a été appelée "maladie bactérienne des eaux froides" (BCWD) (Wood and Yasutake 1956; Holt 1987). En Europe, la bactérie présente également une forte capacité à infecter la truite arc-en-ciel au stade juvénile (**Fig. 3B**). Aussi, d'autres noms ont été donnés à la maladie, comme le "syndrome de l'alevin" (Lorenzen *et al.* 1991) ou le "syndrome de l'alevin de truite arc-en-ciel" (RTFS) (Madsen and Dalsgaard 1998).

#### 1.2.4. Caractéristiques morphologiques et physiologiques

*F. psychrophilum* est un bacille Gram négatif se présentant sous la forme de fins bâtonnets allongés ( $\varnothing$  : 0,20 - 0,75  $\mu\text{m}$  ; L : 1,5 - 7,5  $\mu\text{m}$ ), flexibles et aux extrémités arrondies (**Fig. 4A**). Il s'agit d'une bactérie psychophile (de *psykhros* : froid) qui peut se développer dans une gamme de température comprise entre 4 et 23 °C (Holt 1987; Bernardet and Grimont 1989). Le temps de génération de cette flavobactérie a été évalué à 4 h lorsqu'elle est incubée à 15 °C, sa température optimale de croissance (Holt *et al.* 1993). Sur le milieu AOAE enrichi (Anacker and Ordal 1955) (**Tableau 3**), *F. psychrophilum* se développe sous la forme de colonies rondes de 1 à 5 mm de diamètre, de couleur jaune vif, brillantes, convexes et non adhérentes à la gélose (**Fig. 4B**). Comme la majorité des espèces du genre *Flavobacterium*, *F. psychrophilum* possède une mobilité par glissement sur des surfaces humides. Toutefois, une observation de la position des bactéries par microscopie à plusieurs minutes d'intervalle est nécessaire pour visualiser le phénomène car le glissement de *F. psychrophilum* est plus lent que celui d'autres flavobactéries comme *F. johnsoniae* dont la mobilité sur milieu gélosé est estimée à 60  $\mu\text{m}/\text{min}$  (Bernardet and Grimont 1989; Hunnicutt and McBride 2000).

**Tableau 1.** Espèces déjà infectées par *F. psychrophilum* et leur lieu d'observation initiale.

	Hôte	Localisation
Saumon argenté ou Saumon coho	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	USA, Japon
Saumon royal	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	USA, Canada
Saumon rouge	<i>Oncorhynchus nerka</i>	USA
Saumon du pacifique	<i>Oncorhynchus keta</i>	USA
Amago	<i>Oncorhynchus rhodurus</i>	Japon
Saumon masou	<i>Oncorhynchus masou</i>	Japon
Saumon atlantique	<i>Salmo salar</i>	USA, Australie, Suède, Canada
Truite fario	<i>Salmo trutta</i>	Japon, Finlande, Norvège
Truite de mer	<i>Salmo trutta</i>	Finlande, Suède
Truite arc-en-ciel	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	USA, France, Allemagne, Italie, Canada, Finlande, Royaume Uni, Espagne, Chili, Danemark, Suisse, Irlande du Nord
Truite argentée	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	USA, Canada
Truite fardée	<i>Oncorhynchus clarki</i>	USA, Finlande
Omble de fontaine	<i>Salvelinus fontinalis</i>	USA, Finlande
Omble du Canada	<i>Salvelinus namaycush</i>	USA
Omble chevalier	<i>Salvelinus alpinus</i>	Finlande
Ombre commun	<i>Thymallus thymallus</i>	Estonie
Ayu	<i>Plecoglossus altivelis</i>	Corée, Japon
Carpe	<i>Cyprinus carpio</i>	Allemagne
Carassin	<i>Carassius carassius</i>	Allemagne
Anguille européenne	<i>Anguilla anguilla</i>	Allemagne
Gobi	<i>Chaenogobius urotaenia</i>	Japon
Tribolodon	<i>Tribolodon hakonensis</i>	Japon
Gobi amur	<i>Rhinobogius brunneus</i>	Japon
Poisson dragon	<i>Zacco platypus</i>	Japon
Perche	<i>Perca fluviatilis</i>	Finlande
Gardon	<i>Rutilus rutilus</i>	Finlande
Tanche	<i>Tinca tinca</i>	Allemagne

Le mécanisme du mouvement cellulaire par glissement n'a pas encore été élucidé, bien que plusieurs modèles aient été proposés pour expliquer le phénomène (McBride 2001, 2004). Plusieurs gènes nécessaires au processus ont été identifiés par mutagenèse chez *F. johnsoniae*. Les gènes *gldA*, *gldF* et *gldG* codent des protéines formant vraisemblablement des transporteurs de type ABC et sont nécessaires au glissement de la bactérie (Agarwal *et al.* 1997; Hunnicutt *et al.* 2002) tandis que d'autres gènes sont également requis, qui ne présentent aucune homologie de séquence avec des gènes dont la fonction est connue (Hunnicutt and McBride 2000; McBride *et al.* 2003; McBride 2004; Braun and McBride 2005). Récemment, un mutant insertionnel non mobile par glissement a été identifié également chez *F. psychrophilum* (Alvarez *et al.* 2006). Le gène inactivé par transposition code la protéine TlpB (thiol oxidoreductase-like protein).

Les principales caractéristiques biochimiques de *F. psychrophilum* ont été décrites dans la littérature (Bernardet and Kerouault 1989) (Cipriano and Holt 2005). Comme pour d'autres flavobactéries pathogènes de poissons (*F. columnare*, *F. branchiophilum* et *F. johnsoniae*), *F. psychrophilum* présente un pouvoir protéolytique important mais une incapacité à dégrader les sucres. Cette intense activité protéolytique pourrait expliquer la sévérité des lésions cartilagineuses, musculaires et cutanées induites chez les poissons malades (Otis 1984).

### 1.2.5. Épidémiologie

Actuellement, il est admis que *F. psychrophilum* est capable d'affecter toutes les espèces de poissons salmonidés. Le saumon argenté et la truite arc-en-ciel semblent être particulièrement sensibles à la flavobactériose (Davis 1946; Amos 1985; Holt *et al.* 1993). Certaines espèces de poissons n'appartenant pas à la famille des salmonidés sont également sensibles à la maladie (**Tableau 1**). Cette pathologie concerne principalement les poissons d'élevage mais également certains poissons sauvages. En raison du grand nombre d'espèces de poissons affectés par *F. psychrophilum*, il a été suggéré que celles-ci pourraient constituer des réservoirs permettant l'infection d'espèces de poissons plus sensibles à la flavobacteriose (Nematollahi *et al.* 2003). Initialement, la maladie avait été diagnostiquée uniquement en Amérique du Nord. A partir du milieu des années 1980, cette maladie a connu une diffusion fulgurante, probablement liée à l'intensification des échanges internationaux dans le commerce des poissons et des œufs. Depuis, *F. psychrophilum* a été détectée sur tous les continents à l'exception de l'Afrique (**Tableau 1**).

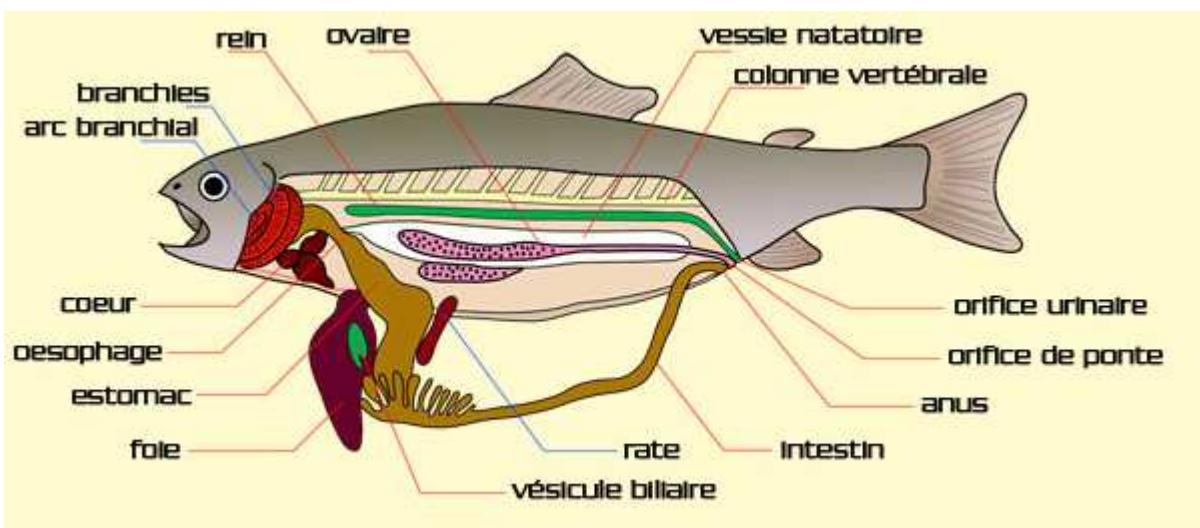


Comme la plupart des maladies infectieuses de poissons, la flavobactériose présente des symptômes peu spécifiques. Les signes cliniques se manifestent différemment aux Etats-Unis et en Europe dans la mesure où, très probablement, les stades de développement ainsi que les espèces de poissons atteints, sont différents (Wood 1974; Holt *et al.* 1993). Aux Etats-Unis, la flavobactériose apparaît essentiellement sur des productions de truites au stade juvénile ou adulte (BCWD), alors qu'en Europe, la maladie touche préférentiellement les alevins (RTFS).

Dans le cas de la forme BCWD, l'infection se déclare sur des poissons présents dans des bains dont la température de l'eau est inférieure à 12 °C bien que de fortes mortalités de poissons adultes aient été enregistrées dans des eaux à 14 °C aux Etats-Unis. Les premiers symptômes se manifestent par un noircissement de la nageoire adipeuse qui s'étend ensuite du pédoncule caudal à la nageoire caudale. La destruction progressive des tissus cutanés et musculaires provoque l'apparition d'ulcères avec exposition de la colonne vertébrale conduisant à la mort de l'animal (Davis 1946) (**Fig. 3A**). Des lésions peuvent apparaître dans la région antérieure des flancs (Bustos *et al.* 1995; Lumsden *et al.* 1996) et de la nageoire dorsale (Wood and Yasutake 1956; Borg 1960; Wood 1974). Des manifestations neurologiques ont été observées également chez des poissons qui présentaient une incoordination des mouvements volontaires avec une nage en spirale. La flavobactérie a été isolée de la cavité crânienne où elle avait provoqué une ostéite et une méningite (Kent *et al.* 1989). Des exophtalmies uni- ou bilatérales ont été également décrites, pouvant conduire à la cécité ou à la perte des yeux (Evensen and Lorenzen 1996).

Dans le cas de la forme RTFS, les alevins atteints ne présentent pas de lésions superficielles mais des atteintes viscérales non spécifiques accompagnées d'une anorexie et d'une anémie des branchies, du foie et des reins. Une augmentation du volume de la rate est souvent observée, ainsi qu'une fragilisation intestinale caractérisée par un prolapsus anal (Baudin-Laurencin *et al.* 1989; Lorenzen *et al.* 1991; Bruno 1992; Santos *et al.* 1992).

Les infections à *F. psychrophilum* peuvent causer des mortalités moyennes comprises entre 30 et 50 % des individus. Elles s'élèvent à 70 % dans le cas de certaines épizooties aiguës touchant les alevins au stade vésiculé pesant de 0,2 à 0,5 g (Santos *et al.* 1992). Lors de co-infections avec d'autres agents ichtyogènes, comme le virus de la nécrose pancréatique infectieuse, le taux de mortalité peut atteindre 80 % du lot de poissons (Guichard 2004). Chez les alevins dont la vésicule vitelline est totalement résorbée, la mortalité est moins élevée, aux alentours de 30 % (Wood 1974). Les épizooties de RTFS les plus importantes se déclarent



**Fig. 5.** Organes internes de la truite arc-en-ciel après dissection du flanc gauche.

sur des poissons de poids compris entre 0,5 et 5,0 g et baignant dans une eau dont la température est inférieure à 10 °C (Bernardet *et al.* 1988; Branson 1995). La capacité de *F. psychrophilum* à induire une mortalité sévère chez les poissons juvéniles a été clairement démontrée (Decostere *et al.* 2001). Toutefois, une étude épidémiologique récente révèle que la flavobactériose touche les poissons à des stades de développement de plus en plus avancés. Ainsi des truites arc-en-ciel de 100 g infectées par *F. psychrophilum* ont été recensées (Guichard 2004).

### 1.3. L'hôte: *Oncorhynchus mykiss*

#### 1.3.1. Taxonomie, phylogénie et habitats

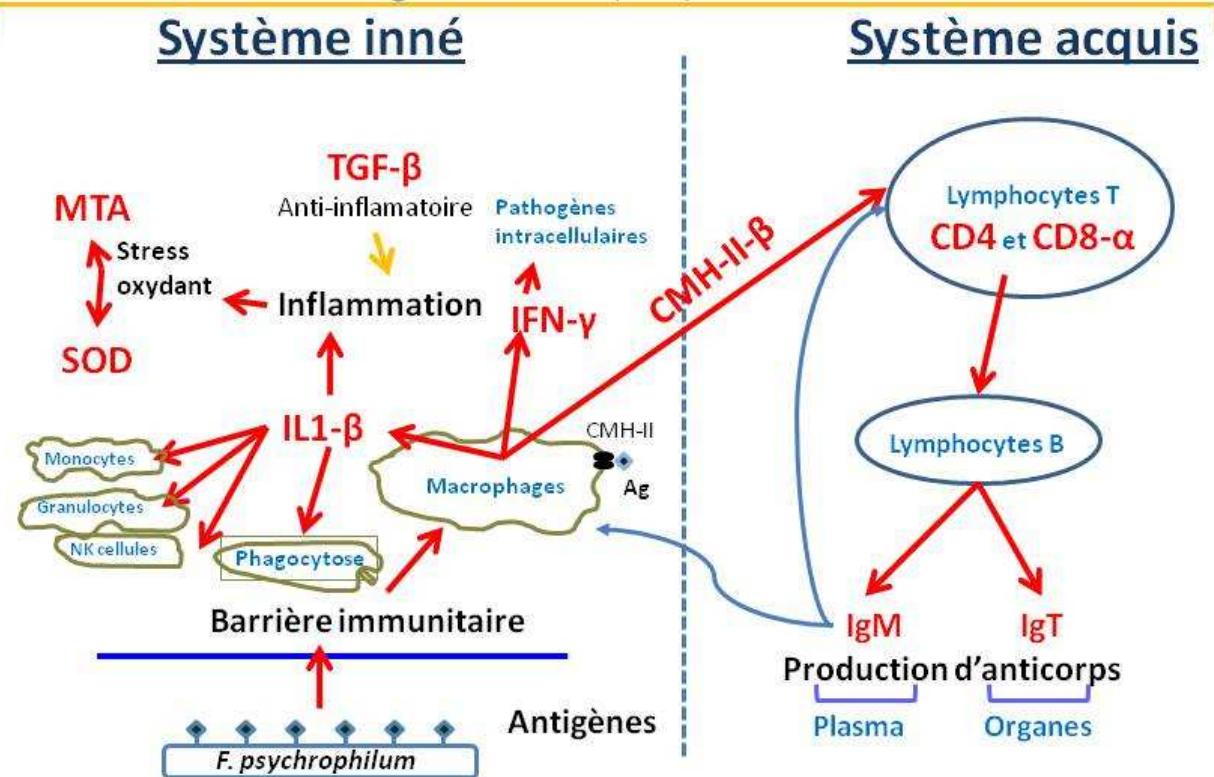
La truite arc-en-ciel est un poisson appartenant à la classe des actinoptérygiens, l'ordre des salmoniformes et la famille des *salmonidae*. Le genre *Oncorhynchus* contient les saumons et truites du pacifique, d'Amérique du nord et de Russie. L'espèce *Oncorhynchus mykiss* a été décrite pour la première fois par Johann Julius Walbaum en 1792 sur la base d'un spécimen du Kamchatka (Russie). D'autres noms ont été donnés à cette espèce par Richardson en 1836, *Salmo gardneri*, et par W. P. Gibbons en 1855, *Salmo iridia*, modifié ensuite en *Salmo irideus*. Cependant, il a été déterminé que toutes ses populations décrites étaient conspécifiques et l'antécédence a été donnée à Walbaum (Behnke 1966). La forme migrante de la truite arc-en-ciel (anadrome) qui évolue une partie de sa vie en mer, essentiellement dans le pacifique, est appelée truite argentée et appartient à la même espèce. La truite arc-en-ciel passe toute sa vie dans les rivières alors que la truite argentée passe sa première année en mer avant de revenir en rivière pour acquérir sa maturité sexuelle et se reproduire. Elle retourne ensuite en mer. Contrairement aux saumons, la truite arc-en-ciel peut se reproduire plusieurs fois au cours de sa vie qui peut durer jusqu'à 11 années (Froese and Pauly 2006).

#### 1.3.2. Morphologie générale

La truite arc-en-ciel a une morphologie caractéristique des salmonidés (**Fig. 5**). Son corps est allongé, elle possède une forte musculature et une nageoire caudale puissante taillée pour la nage rapide. L'équilibre lors de la nage est assuré par les nageoires pectorales, abdominales et la nageoire dorsale. Elle possède aussi une nageoire annale et une nageoire molle dorsale très atrophiées sans rôle connu. L'appareil digestif est court, typique d'un carnassier, l'estomac en représente 1/7<sup>eme</sup> en longueur. Elle possède un foie, une vésicule

# Système immunitaire

Organes : branchies, foie, rein et rate



**Fig. 6.** Schéma du système immunitaire de la truite arc-en-ciel connu et des biomarqueurs retenus pour cette étude. Au gauche, figurent les acteurs du système immunitaire inné et à droite ceux du système immunitaire acquis. Les protéines marqueurs que nous avons sélectionnés sont en rouges, nous en testerons l'expression des gènes correspondants. Il s'agit d'un marqueur de l'inflammation : l'interleukine 1-  $\beta$  (IL1- $\beta$ ) ; de deux marqueurs du stress oxydant : une métallothionéine (MTA) et la superoxyde dismutase (SOD) ; d'une cytokine anti-inflammatoire, le facteur de croissance transformant  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ; d'un marqueur de pathogène intracellulaire, l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ; du complexe majeur d'histocompatibilité de type 2 (CMH-II) ; de deux marqueurs de l'activation et de la différenciation des lymphocytes T, les cluster de différenciation 4 et 8 (CD4 et CD8- $\alpha$ ) ; des immunoglobulines de type M et T (IgM et IgT). Les flèches rouges représentent les voies d'activation testées, les flèches bleus, les liens entre systèmes acquis et inné.

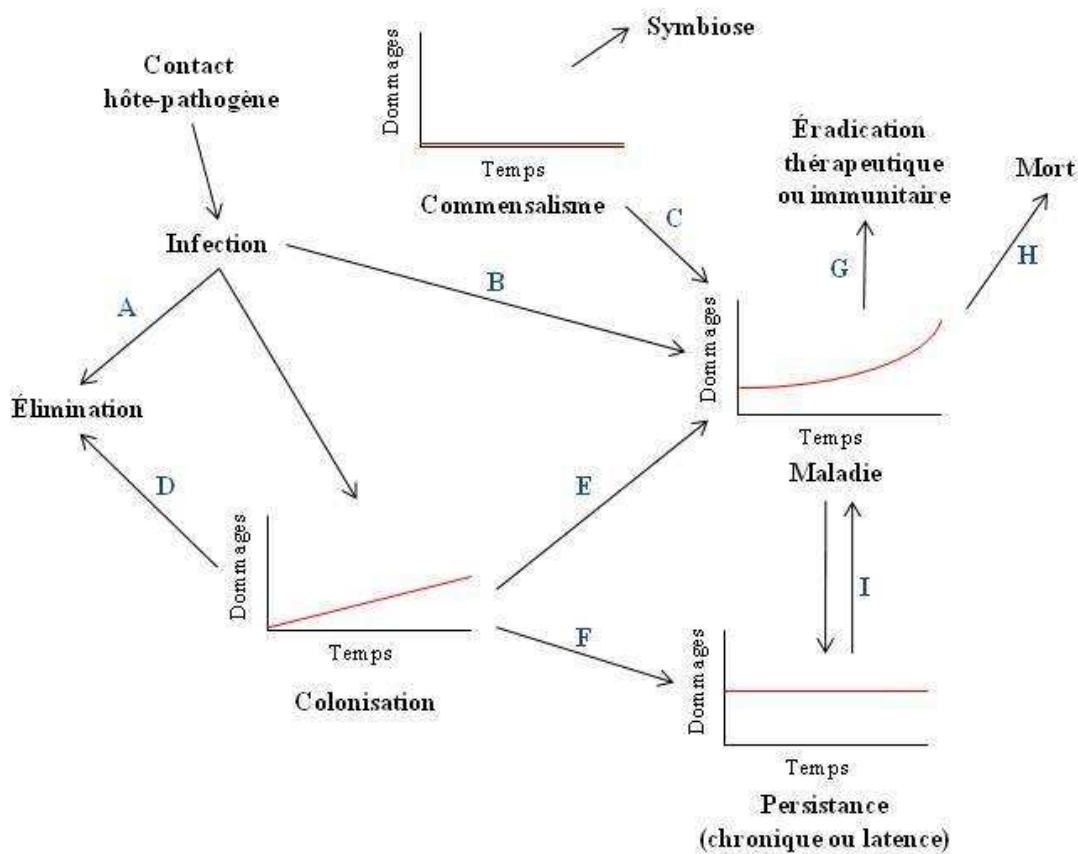
biliaire reliée à la base de l'estomac ainsi qu'un hépatopancréas plumeux qui assure la sécrétion des enzymes digestives. La rate est fixée par du tissu conjonctif à l'intestin. Le rein est longiligne, localisé le long de la colonne vertébrale dans laquelle il est encastré en partie apicale. La présence d'une vessie natatoire, localisée sous le rein et au-dessus des gonades, sert de "ballast" à la truite au cours de la nage.

### 1.3.3. Le système immunitaire de la truite arc en ciel

Le poisson, comme tous les vertébrés, possède un système immunitaire inné qui compose la première ligne de défense contre un microorganisme externe et un système immunitaire acquis, spécifique d'un pathogène, avec une capacité de mémoire. La médiation du système immunitaire du poisson peut se faire par la voie cellulaire ou humorale. Comme chez les mammifères, les systèmes immunitaires innés et acquis sont complémentaires, le premier précède généralement le second. En effet, le système inné détermine la nature du système acquis et coopère avec ses acteurs tout au long de la réponse (Fearon and Locksley 1996; Fearon 1997). L'ensemble des biomarqueurs, du système immunitaire retenu pour cette étude, est schématisé en **Fig. 6**.

Par définition, le système immunitaire inné reconnaît le "non soi" par des motifs particuliers via des récepteurs portés à la surface de lignées cellulaires spécifiques. Ces motifs peuvent être des polysaccharides, lipopolysaccharides (LPS), peptidoglycans, de l'ADN bactérien et des ARN viraux double-brins ou d'autres protéines non habituelles présentes à la surface de cellules d'organismes multicellulaires (Medzhitov and Janeway 2002). Le poisson possède trois types de cellules douées de phagocytose : les granulocytes (neutrophiles), les monocytes (ou macrophages) et des cellules cytotoxiques non spécifiques ou "Natural Killers" (NK cells) (Froystad *et al.* 1998; Evans *et al.* 2001). Des cellules épithéliales et dendritiques peuvent également participer à la réponse immunitaire non spécifique (Press *et al.* 1994). Les macrophages représentent les principaux acteurs de la famille des CPA (Cellules Présentatrices d'Antigène) car ils sont porteurs du complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH-II).

Le système immunitaire acquis mature au niveau des trois organes lymphoïdes majeurs du poisson : le thymus, localisé dans la boîte crânienne au-dessus des branchies (presque impossible à disséquer), le rein et la rate. Il se compose de deux types de cellules : les lymphocytes B capables de se différencier en lignées productrices d'immunoglobulines



**Fig. 7.** Issues et modalités de la relation hôte-pathogène en fonction des dommages causés dans le temps proposé par Casadevall et Pirofski. La quantité de dommages peut être variable selon le cas étudié. A : l’acquisition d’un pathogène peut être suivie par son élimination aux barrières défensives ou aux défenses immunitaires. B : l’acquisition d’un pathogène provoque directement des dommages et une maladie. C : certains microbes commensaux peuvent causer une maladie si l’état de commensalisme est perturbé par une diminution du système immunitaire ou une perturbation de la flore microbienne de l’hôte. D : l’état de colonisation peut être terminé par l’activation d’une réponse immunitaire à partir d’un certain seuil de dommages. E : L’état de colonisation peu aboutir à la maladie après un seuil de dommages atteint. F : l’état de colonisation peut aboutir à un état de persistante où le système immunitaire est incapable d’éradiquer l’infection et les dommages persistent de façon continue. G : une réponse immunitaire ou une thérapie peuvent éradiquer l’infection mais pas nécessairement la maladie car l’infection a peu causer des dommages irréversibles. H : si la relation hôte-pathogène a causé suffisamment de dommages, la mort s’ensuit. I : la persistante de l’infection peut causer à long terme l’apparition ou la réapparition de la maladie.

(plasmocytes) et en lignées mémoires ; les lymphocytes T pouvant se différencier en lignées cytotoxiques (CD8- $\alpha$  positifs) ou en lignées "helpers" (CD4 positifs) (Miller *et al.* 1998; Scapigliati *et al.* 1999; Kollner *et al.* 2001). La médiation humorale prend une part importante de la réponse immunitaire acquise de par la production d'anticorps. Il existe une seule forme bien caractérisée des anticorps circulants chez le poisson appelés IgM-like car analogues aux IgM des mammifères. Ils diffèrent par leur structure tétramérique et non pentamérique et leur masse moléculaire d'environ 700 kDa (Castillo *et al.* 1993; Andersson *et al.* 1995). Il a été récemment découvert un nouveau type d'anticorps chez la truite arc-en-ciel appelé IgT produit dans le rein et la rate (Hansen *et al.* 2005). Le poisson possède aussi un système du complément qui peut être activé par la voie classique dépendante des immunoglobulines, la voie alterne ainsi que la voie des lectines (Magnadottir *et al.* 2005).

Comme chez les mammifères, un certain nombre de cytokines jouent un rôle de modulateur du système immunitaire chez les poissons. Il existe des cytokines pro-inflammatoires dont les principales sont le "tumor necrosis factor" produit dans le rein (TNF- $\alpha$ ), l'interleukine 1- $\beta$  produite par les macrophages (IL1- $\beta$ ), l'interleukine 6 (IL6) ou encore l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Secombes *et al.* 2001). Une cytokine potentiellement anti-inflammatoire est aussi connue, le "transforming growth factor  $\beta$ " (TGF- $\beta$ ) (Harms *et al.* 2000). De plus, le processus d'inflammation et de réponse immunitaire est connu pour générer un stress oxydant (Knight 2000) dont nous connaissons certains marqueurs, à travers l'expression des gènes codant : les métallothionéines (MTA) et la superoxyde-dismutase (SOD).

## 1.4. La relation hôte-pathogène

### 1.4.1. Définitions

La relation hôte-pathogène se définit comme la présence d'un pathogène sur ou dans un hôte. Elle est modulée par une compétition entre la résistance de l'hôte envers le pathogène et la virulence du pathogène envers l'hôte, toutes deux pouvant être très variables. Il existe différents types de relation hôte-pathogène qui sont résumés **Fig. 7** selon les terminologies les plus récentes (Casadevall and Pirofski 1999, 2000). L'infection est l'acquisition d'un pathogène par un hôte. L'éradication de ce pathogène peut avoir lieu au premier contact par des mécanismes physiques (barrière cutanée) ou immunitaires externes (immunoglobulines ou enzymes présentes sur le tégument). Le commensalisme est défini par



une interaction hôte-pathogène qui ne provoque pas des dommages perceptibles ou persistants ; le premier contact pouvant causer des dommages réversibles. Il est aussi à noter que les microorganismes commensaux sont antigéniques et peuvent générer une réponse immunitaire. Nous définissons ici la maladie comme une manifestation clinique des dommages causés par l'interaction hôte-pathogène. La colonisation est donc définie par la présence et la croissance d'un microorganisme dans l'hôte pour une durée variable. Dans le cas où les dommages sont imperceptibles, il n'y a pas de différence entre colonisation et commensalisme. Lorsque la colonisation se prolonge et crée des dommages continus dans le temps, l'issue est la persistance. Ainsi, la maladie, la colonisation et la persistance sont des issues différentes de l'infection mais sont potentiellement liés par l'apparition de dommages.

#### **1.4.2. Perturbations de la relation hôte-pathogène**

Nous avons vu précédemment que la perturbation de la relation hôte-pathogène peut faire évoluer leur situation respective considérablement. En effet, l'affaiblissement du système immunitaire de l'hôte peut par exemple conduire au passage de l'état de persistance ou de commensalisme à celui de maladie. En revanche, la vaccination ou le traitement thérapeutique de l'hôte peut conduire le pathogène à l'état de persistance, de commensal ou l'éradiquer.

De très nombreux facteurs peuvent influencer la relation hôte-pathogène, les mesures prophylactiques bien sûr mais aussi l'environnement, l'état de santé et de stress du poisson. En effet, tous ces facteurs peuvent influencer la capacité de l'hôte à résister au pathogène ou la virulence du pathogène.

#### **1.4.3. Impact de l'environnement aquatique sur la relation hôte-pathogène**

Les facteurs environnementaux sont nombreux dans le milieu aquatique et peuvent à la fois moduler la résistance de l'hôte vis-à-vis du pathogène et la virulence de ce dernier.

Nous avons vu plus en amont que la température est un facteur important quant à la pathogénicité de *F. psychrophilum*. Elle l'est aussi pour le système immunitaire de la truite pour lequel la médiation cellulaire semble à son optimum entre 15 et 17 °C contre 10 et 12 °C pour la médiation humorale (Kollner and Kotterba 2002).



## *1. Synthèse bibliographique*

Il existe de nombreux exemples d'études révélant l'impact de facteurs environnementaux sur la virulence d'un pathogène. Certains de ces facteurs peuvent être physiques (température, débit ...) ou chimiques (pH, dureté, nutriments...). En effet, les bactéries sont pathogènes car elles trouvent chez leur hôte un environnement qui leur est favorable du point de vue physique (souvent) et nutritionnel (toujours). Un pathogène peut acquérir presque tous les nutriments dont il a besoin chez son hôte (C, H, N, O, P, cations...) à l'exception de quelques uns comme le fer. Ainsi, la plupart des bactéries pathogènes du milieu aquatique survivent dans l'eau et vivent dans leur hôte.



## 1.5. Stratégie de l'étude

L'objectif de la thèse est de mieux comprendre la relation hôte-pathogène entre *F. psychrophilum* et la truite arc-en-ciel (titration de la bactérie et prévalence dans les aquacultures), d'évaluer l'impact potentiel de l'environnement sur cette relation et de poursuivre un travail de recherche sur les mesures prophylactiques possibles pour lutter contre cette maladie.

Dans un premier temps, il était nécessaire de localiser et de quantifier la bactérie sur et dans les poissons. Nous avons donc mis au point une technique de quantification de *F. psychrophilum* par la PCR en temps réel en ciblant un fragment spécifique du génome de la flavobactéries. Cette technique a été ensuite validée sur des échantillons de poissons contaminés artificiellement en laboratoire, et issus de piscicultures.

Dans un second temps nous avons cherché à étudier l'impact d'une contamination métallique sur la relation hôte-pathogène. Il s'agissait de mesurer l'effet d'une exposition chronique à une faible dose de cadmium (1 µg/L durant deux mois) sur la capacité de la bactérie à infecter le poisson ainsi que sur la réponse immunitaire de ce dernier. Un travail préliminaire a démontré que la bactérie est hypersensible au cadmium ajouté dans son milieu de culture. Cependant, nous n'avons pas réussi à recréer la maladie lors de cette étude. Ainsi, nous avons pu mesurer l'impact du cadmium sur l'expression de marqueurs immunitaires du poisson mais pas sur la virulence de la bactérie. Cette difficulté, à reproduire la maladie, indique nécessairement que la relation hôte-pathogène est complexe et que la pathogénicité de la bactérie et la sensibilité du poisson ne sont pas systématiques.

Ainsi, il a été décidé de s'orienter vers le terrain. Nous avons donc contacté 7 piscicultures d'Aquitaine ayant des caractéristiques différentes avec des occurrences de mortalité présentant des degrés différents de sévérité. Lors de ce travail, nous nous sommes inspirés d'une étude réalisée précédemment que nous présenterons dans ce manuscrit. Nous avions contaminé le poisson zèbre avec de l'eau provenant de sites naturellement contaminés par le cadmium et le zinc sur le Lot et ses affluents. Dans les 7 piscicultures choisies, nous avons donc quantifié la bactérie sur et dans les organes des poissons, mesuré le taux d'anticorps dans leur plasma, l'expression de gènes marqueurs du stress et de l'immunité. En parallèle, nous avons dosé les métaux dans l'eau des bassins d'élevage afin d'observer une éventuelle corrélation entre la charge métallique et l'occurrence de la maladie dans les



## *1. Synthèse bibliographique*

différents sites. Ce travail nous a permis entre autres d'identifier le type de relation hôte-pathogène (**Fig. 7**) constitué par le couple *O. mykiss-F. psychrophilum*.

Enfin, dans un troisième temps, nous présenterons un travail de recherche d'un vaccin protecteur du poisson contre *Flavobacterium psychrophilum*. Un certain nombre d'immunogènes ont été identifiés et caractérisés à la surface de la bactérie, potentiellement utilisables dans un cocktail vaccinant. Nous avons cherché ensuite à synthétiser des nanoparticules organiques pouvant à terme servir de vecteur pour ce cocktail dans le cadre d'une vaccination orale du poisson. Il s'agit d'une approche séduisante pour vacciner en masse des animaux d'intérêt commercial par rapport à une vaccination par injection plus classique.



## **2. Matériel et méthode général**

**Tableau 2. Souches *F. psychrophilum***

<b>Espèce</b>	<b>Souche</b>	<b>Origine</b>	<b>Milieu de culture</b>
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	JIP02/86	Inra Jouy en Josas	AOAE, AOAES
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	NCIMB47	NCIMB	AOAE, AOAES
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	G4	Enitab	AOAE, AOAES
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	P0388	Enitab	AOAE, AOAES
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	F6	Enitab	AOAE, AOAES
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	08-2829	LD40	AOAE, AOAES
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	08-194	LD40	AOAE, AOAES
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	08-255	LD40	AOAE, AOAES
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	08-214	LD40	AOAE, AOAES
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	AU 0205	Chili	AOAE, AOAES
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	AU 2706	Chili	AOAE, AOAES

**Tableau 3. Milieux de culture de *Flavobacterium spp* (pour 1 L)**

	<b>AOAE</b>	<b>AOAES</b>	<b>TYES</b>	<b>MOB-G</b>	<b>FLP</b>
Triptone	5 g	5 g	4 g		4 g
Extrait de levure	0,5 g	0,5 g	0,4 g	0,5 g	0,5 g
Extrait de bœuf	0,2 g	0,2 g	-		0,2 g
Peptone				5 g	
D-glucose				0,5 g	0,5 g
Acétate de Sodium	0,2 g	0,2 g	-	10 mg	0,2 g
Sulfate de Magnésium	-	-	0,5 g		
Chlorure de Calcium	-	-	0,2 g		
Sérum de veau foetal	-	10 ml	-		
Agar (milieu solide)	15 g	15 g	15 g	15 g	15 g
pH ajusté à 7,2					

**Tableau 4. Milieux de culture de *E. coli* (pour 1 L)**

	<b>LB</b>	<b>SOC</b>
Triptone	10 g	20 g
Extrait de levure	5 g	5 g
NaCl	10 g	0,5 g
KCl	-	0,2 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	-	2,46 g
MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	-	2,03 g
A-D-Glucose	-	3,6 g
Agar (milieu solide)	15 g	-

## 2.1. Matériels biologiques

### 2.1.1. *Flavobacterium psychrophilum* : souches et conditions de culture

Les souches de *F. psychrophilum* utilisées au cours de cette étude, ont été isolées à partir de différentes espèces de poissons possédant les signes cliniques de la flavobactériose (**Tableau 2**). Les flavobactéries sont cultivées à 18 °C en aérobiose (agitation orbitale, 180 rpm) dans le milieu AOAE modifié, décrit initialement par Anacker et Ordal (1955) : le milieu est tamponné à pH 7,2 avec de l'acétate de sodium à 0,02 % (p/v). Pour certaines flavobactéries et notamment celles qui ont été isolées récemment, du sérum de veau foetal à 5 % (v/v) est ajouté dans le milieu de culture (AOAES) afin de permettre la croissance des cellules. D'autres milieux comme le TYES, le MOB-G et le FLP ont été testés (**Tableau 3**).

Le développement des cellules est suivi par des mesures régulières d'absorbance à 600 nm ( $A_{600}$ ). Les cultures sont arrêtées peu avant la fin de la phase exponentielle de croissance ( $A_{600} = 0,5$ ). L'absence de contaminants dans les préparations bactériennes est vérifiée par des observations au microscope photonique (objectif  $\times 100$ ; oculaires  $\times 10$ ) après coloration de Gram, mais également par étalement des suspensions bactériennes sur des boîtes de Petri contenant du milieu AOAE modifié, ou du milieu LB, supplémenté avec de l'agar à 1,5 % (p/v). Après une période de refroidissement des cultures dans la glace fondante, les flavobactéries sont récupérées après centrifugation ( $6\,000 \times g$ , 10 min, 4 °C) et lavées deux fois, afin d'éliminer les traces du milieu de culture, dans du tampon PBS (NaCl 137 mM ; KCl 2,7 mM ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM ; pH 7,4) afin de prévenir la lyse prématuée des flavobactéries.

### 2.1.2. *Escherichia coli* : souches et conditions de culture

La souche JM109 (Promega) de *E. coli* [*endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* ( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ ), *relA1*, *supE44*,  $\Delta$ ( *lac-proAB*), [F' *traD36*, *proAB*, *laqI<sup>q</sup>ZΔM15*]] a été utilisée comme bactérie hôte pour le clonage et l'amplification des plasmides. Elle est cultivée dans du milieu LB (**Tableau 4**) à 37 °C sous agitation (150 rpm). En fonction des plasmides hébergés, le milieu de culture est supplémenté avec de l'ampicilline (50 µg/mL).

**Tableau 5. Souches bactériennes types et pathogènes des poissons**

Espèce	Souche	Origine	Milieu de culture
<i>Flavobacterium branchiophilum</i>	FL15	Inra Jouy en Josas	TYES
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	UW101	ATCC	AOAE, AOAES
<i>Flavobacterium columnare</i>		LD40	AOAE, AOAES
<i>Yersinia ruckeri</i>	07-1845	LD40	YRM
<i>Yersinia ruckeri</i>	07-1884	LD40	YRM
<i>Yersinia ruckeri</i>	07-1726	LD40	YRM
<i>Yersinia ruckeri</i>	AU-0602	Chili	YRM
<i>Aeromonas salmonicida</i>	08-1492	LD40	CBB
<i>Aeromonas salmonicida</i>	08-1494	LD40	CBB
<i>Aeromonas salmonicida</i>	AU-3103	Chili	CBB
<i>Vibrio alginoliticus</i>	08-2498	LD40	TCBS
<i>Vibrio vulnificus</i>	?	LD40	TCBS
<i>Vibrio anguillarum</i>	AU-	Chili	TCBS
<i>Vibrio ordelii</i>	AU-3006	Chili	TCBS
<i>Serratia liquefaciens</i>	01.6603	LD40	LB
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	7504	LD40	LB
<i>Shewanella putrefaciens</i>		LD40	LB
<i>Salmonella enterica</i> sp <i>indiana</i>		Enitab	LB
<i>Escherichia coli</i>	JM109	Promega	LB
<i>Escherichia coli</i>	K12	NCIMB	LB
<i>Enterococcus faecalis</i>		Enitab	MRS
<i>Bacillus megaterium</i>		Enitab	MRS
<i>Listeria innocua</i>		Enitab	MRS
<i>Staphylococcus aureus</i>		Enitab	MRS
<i>Pediococcus acidilactici</i>		Enitab	MRS

**Tableau 6. Milieux de culture de *Y.ruckeri* (YRM) et de *A. salmonicida* (CBB) (pour 1 L)**

	YRM	CBB
Soja tripsyque (TS)	30 g	30 g
SDS	10 g	
Bleu de Coomassie G-250	0,1 g	0,1 g
Rouge Congo	0,1 g	
Agar (milieu solide)	15 g	15 g

### 2.1.3. Autres bactéries types ou pathogènes de poissons

D'autres souches bactériennes ont été utilisées au cours de ce travail. Elles provenaient principalement de laboratoires vétérinaires ou de la souchothèque de l'ENITA de Bordeaux (**Tableau 5**). Les flavobactéries non-*psychrophilum*, *F. branchiophilum*, *F. johnsoniae* et *F. columnare*, sont cultivées respectivement dans du milieu TYES (**Tableau 3**), AOAE et AOAE. D'autres pathogènes de poisson, *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas salmonicida* et les bactéries du genre *Vibrio* sont cultivées respectivement dans les milieux YRM, CBB (**Tableau 6**) et TCBS (**Tableau 7**). Les eubactéries Gram<sup>+</sup> sont cultivées dans le milieu MRS (**Tableau 8**). Enfin, toutes les autres bactéries sont cultivées dans le milieu LB.

### 2.1.4. Truites arc-en-ciel

Les poissons utilisés au cours de cette étude sont des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) qui proviennent de diverses piscicultures d'Aquitaine. Les truites d'environ 5 g sont disposées par lot de 20 individus dans des bassins de 300 L alimentés en flux continu (1 L/min) avec de l'eau, du réseau de la ville d'Arcachon, déchlorée sur colonne et filtrée par passage sur charbon actif. Les poissons sont alimentés quotidiennement avec des granulés calibrés en fonction du poids des animaux (Skretting, Nutra HP<sup>®</sup>; **Tableau 9**) à raison de 2 g d'aliment pour 100 g de poisson frais. Alternativement, des truites adultes, d'environ 200 g sont élevées dans les mêmes conditions par lots de 5 individus par bassin. En parallèle, des poissons, en cours d'élevage en pisciculture, (7 sites aquitains) ont été analysés sur une période de 6 mois afin de suivre les éventuels épisodes de flavobactériose hivernale.

### 2.1.5. Poissons zèbre

Des poissons zèbre (*Danio rerio*) adultes ont été placés au hasard dans 3 bacs de 60 litres chacun, disposant d'une résistance chauffante à 25 ± 3°C, d'un bulleur pour réaliser le brassage et l'oxygénéation des poissons. Ils ont été nourris quotidiennement par une quantité de nourriture sèche (Granomix JBL) représentant 5 % de leur masse corporelle. La nourriture contenait 38 % de protéines, 6 % de matière grasse, 4 % de fibres, 9 % de cendres, 0,9 % de phosphore, 25 UI/g de vitamines A, 0,4 mg/g de vitamine C, 3 mg/g de vitamine D3 et 0,33 mg/g de vitamine E. L'eau des bacs a été changée par tiers chaque jour afin d'éliminer les excréments, les particules en suspension et de maintenir constantes les concentrations en métaux. Le renouvellement a été effectué par prélèvement *in situ* de 20 litres au niveau des

**Tableau 7. Milieu de culture de *Vibrio spp* (pour 1 L)**

TCBS	
Bleue de bromothymol	0,04 g
Citrate ferrique	1 g
Peptone	10 g
Bile de boeuf	5 g
NaCl	10 g
Cholate de sodium	3 g
Citrate de sodium	10 g
Thiosulfate de sodium	10 g
sucrose	20 g
Bleue de thymol	0,04 g
Extrait de levure	5 g
Agar (milieu solide)	14 g
pH ajusté à 8.6	

**Tableau 8. Milieu de culture de bactéries Gram+ (pour 1 L)**

MRS	
Ammonium citrate dibasique	2 g
K2PO3	2 g
glucose	20 g
MgSO4	0,1 g
MnSO4	0,05 g
Extrait de boeuf	5 g
acetate Na	5 g
Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Agar (milieu solide)	12 g
pH 6.5	

sites d'étude (Aveyron) dans des bidons. Cette eau a été préalablement chauffée à  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$  avant d'être mise dans les bacs. 35 poissons ont été prélevés pour chaque temps T3, T7 et T14 jours. Les poissons ont été tués par choc thermique à  $-20^{\circ}\text{C}$  et transportés jusqu'au laboratoire dans de la Carboglace<sup>TM</sup>.

## 2.2. Techniques préparatoires

### 2.2.1. Préparation des différentes fractions de *F. psychrophilum*

Après l'étape de lavage des flavobactéries, celles-ci sont reprises dans de l'eau ultrapure (qualité MilliQ) afin de favoriser la lyse bactérienne. Cette eau est supplémentée avec du fluorure de phényl méthyl sulfonide (PMSF) 0,4 mM ou d'un cocktail d'inhibiteurs (Roche) afin de minimiser l'action des protéases endogènes. La lyse des bactéries est réalisée aux ultrasons (24 Watts) à la température de la glace fondante : dix cycles de 10 secondes séparés par 30 secondes de refroidissement. L'efficacité de l'action des ultrasons, est évaluée, par observation au microscope du lysat bactérien après coloration de Gram. Les macro-débris cellulaires et les cellules intactes sont ensuite éliminés par centrifugation ( $4\ 000 \times g$ , 30 min, 4 °C). Les vésicules membranaires, contenues dans le surnageant, sont récupérées par ultracentrifugation ( $260\ 000 \times g$ , 15 min, 4 °C). Le culot membranaire, (mélange de membrane externe, membrane plasmique et membrane « mixte »), est repris dans du PBS puis lavé deux fois dans ce même tampon. La préparation de cette suspension membranaire est conservée sous la forme d'une suspension ajustée à 10 mg de protéines/mL à -20 °C.

La méthode utilisée, pour isoler la membrane externe de *F. psychrophilum*, est inspirée de celles décrites par Rahman *et al.* (2002) et Rhomberg *et al.* (2004) avec quelques modifications mineures. Les enveloppes, contenues dans la suspension membranaire obtenue précédemment, sont récupérées par ultracentrifugation ( $260\ 000 \times g$ , 15 min, 4 °C), reprises dans un volume de tampon HEPES 10 mM (pH 7,4) puis mélangées dans un volume de lauryl sarcosinate de sodium (= Sarkosyl) à 2 % (p/v). Après une période d'incubation de 20 minutes à température ambiante, le matériel insoluble dans ce détergent, c'est-à-dire la fraction « membrane externe » de *F. psychrophilum*, est collecté par ultracentrifugation et lavé extensivement ( $\times 10$ ) avec le tampon HEPES afin d'éliminer toutes traces résiduelles de Sarkosyl.

**Tableau 9. Composition de l'aliment pour poisson : NUTRA HP 0,75 (Skretting)**

Matière grasse brute	18,0 %
Matières protéiques brutes	55,0 %
Cendres brutes	10,0 %
Cellulose brute	0,5 %
Phosphore	1,3 %
Cuivre	8,0 %
Vitamine A	15 000 UI/kg
Vitamine D3	1 125 UI/kg
Vitamine E	225 UI/kg

### 2.2.2. Purification de l'ADN génomique de *F. psychrophilum*

Le protocole de purification d'ADN génomique utilisé est celui décrit par Marmur (1961) avec quelques modifications. Les flavobactéries en culture (10 mL ;  $A_{600} = 0,6$ ) sont centrifugées ( $6\,000 \times g$ , 10 min, 4 °C) puis remises en suspension dans du tampon TE (EDTA 50 mM ; Tris-HCl 10 mM) (pH 8). Les cellules sont ensuite lysées par une incubation de 2 heures à 37 °C en présence de SDS à 5 % (p/v) et de protéinase K (200 µg/mL). La fraction protéique est alors éliminée, par quatre extractions successives, au phénol/chloroforme/alcool isoamylque (25/24/1; v/v/v), suivies de deux extractions, au chloroforme/alcool isoamylque (24/1 ; v/v). Les acides nucléiques sont précipités par addition de deux volumes d'éthanol à 95 % en présence d'acétate de sodium 0,3 M (pH 5,2). Après centrifugation ( $20\,000 \times g$ , 30 min, 4 °C), le culot obtenu est remis en solution dans du tampon TE puis incubé en présence de la RNase pancréatique (50 µg/mL ; 1 h à 37 °C). L'ADN est ensuite purifié par deux extractions successives au phénol/chloroforme/alcool isoamylque puis précipité comme précédemment. Après un lavage à l'éthanol à 70 %, l'ADN est séché sous vide avant d'être remis en solution dans du tampon Tris-HCl 10 mM (pH 8,5) puis conservé au congélateur à -20 °C.

### 2.2.3. Préparation de l'ADN total de poisson

#### *Truite arc-en-ciel*

Les tissus de poisson (branchie, muscle, peau, foie, rein et rate) sont prélevés aseptiquement puis conservés à -20 °C. Après décongélation, l'ADN total est extrait à l'aide du kit DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. Brièvement, les tissus ( $\approx 40$  mg) sont lysés sur la nuit dans un tampon de lyse contenant de la protéinase K. Le lysat obtenu est ensuite dispersé dans de l'éthanol à 95 % puis soumis à une étape de séparation sur colonne d'affinité. Après deux rinçages par des tampons chargés en sels, l'ADN total est élué de la colonne avec 200 µL de tampon TE puis stocké au froid à -20 °C.

#### *Poisson zèbre*

Les corps entiers des poissons ont été broyés et digérés sur la nuit avec 10 mL/g du tampon d'extraction suivant : 10 mM Tris, pH 8, 100 mM EDTA, 0,5 % de SDS, 200 µg/mL



de protéinase K. Après traitement à la RNase A (100 µg/mL) pendant 2 heures, l'extrait subit deux extractions au phénol équilibré à pH 8, puis une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1), pH 8. L'ADN génomique contenu dans la phase aqueuse recueillie est précipité par ajout de NaCl 0,2 M et de 2 volumes d'éthanol absolu à -20 °C. L'ADN se présente alors sous forme d'une pelote, rincée 2 fois dans de l'éthanol à 70% et stockée à -20 °C. Après avoir séché la pelote pour enlever toute trace d'éthanol, elle est dissoute dans du tampon TE (Tris 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM). La quantification de l'ADN est réalisée par lecture de l'absorbance à 260 nm, longueur d'onde d'absorption maximale des acides nucléiques (1 unité A<sub>260</sub> correspond à 50 µg d'ADN/mL).

#### 2.2.4. Extraction des ARN totaux et synthèse des ADNc

Les tissus de poisson (branchies, foie, rein et rate) sont disséqués rapidement, en conditions d'asepsie contrôlées, puis stockés à -80 °C directement dans un tampon contenant des inhibiteurs de RNases (RNA latter, Qiagen). Après décongélation, les ARN totaux sont extraits avec le kit Absolutely RNA Miniprep Kit (Agilent Technologies) selon les recommandations du fabricant. Brièvement, les tissus (max 50 mg en poids humide) sont lysés, dans un tube Eppendorf, mécaniquement à l'aide d'un mortier et chimiquement dans un tampon contenant l'isothiocyanate de guanidine comme agent dissociant. Le lysat obtenu est ensuite filtré afin d'éliminer les débris tissulaires et membranaires. Une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1 ; v/v/v) est ensuite réalisée afin d'éliminer les protéines de la préparation. Après centrifugation (20 000 × g, 10 min, 4 °C), les acides nucléiques présents dans le surnageant sont adsorbés sur une colonne d'affinité et incubés en présence de DNase (1 h à 37 °C). Après une étape de lavage de la colonne, les ARN totaux sont élus avec 50 µL de tampon d'élution puis stockés à -80 °C. La qualité des ARNs est évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %. Les ADNc sont obtenus à partir de 11,7 µL d'ARN totaux à l'aide du kit AffinityScript® multiple temperature RT (Agilent Technologies). Brièvement, les ARNs en solution sont incubés (5 min à 65 °C) après addition de 2 µL d'oligo(dT) (0,5 µg/µL), de 1 µL d'un mélange d'amorces aléatoires (nonamères ; 0,1 µg) et de l'eau ultrapure traitée au DEPC (qsp 38 µL). La réaction est initiée par l'addition de 40 unités d'inhibiteurs des RNases, 2 µL de dNTPs (= 4 × 50 nmol), 5 µL de tampon first-strand buffer [10×] et 50 unités d'AffinityScript® reverse transcriptase. Le mélange réactionnel est ensuite incubé 20 minutes à 42 °C puis 40 minutes à 54 °C dans un



thermocycleur (Eppendorf). Les ADNc (brin complémentaire) sont alors directement conservés à -20 °C.

### 2.2.5. Purification de l'ADN plasmidique d'*E. coli*

Les plasmides sont purifiés, à l'aide du kit Qiaprep spin miniprep (Qiagen), à partir de cultures d'*E. coli* en suivant le protocole recommandé par le fournisseur (Qiagen). La concentration en ADN plasmidique récupéré est évaluée par des mesures d'absorbance à 260 nm ( $A_{260}$ ) et la pureté des préparations est estimée après détermination du rapport  $A_{260}/A_{280}$  ( $\approx 1,8$ ). La concentration en ADN plasmidique exprimée en nombre de copies du plasmide par  $\mu\text{L}$  est déterminée en tenant compte de l' $A_{260}$  lue, de la masse molaire du plasmide (650 g/mole/paires de bases) et de la constante d'absorption connue de l'ADN double brin (50  $\mu\text{g}$  d'ADN/mL/unité d'absorbance) selon l'équation suivante :

$$[\text{Plasmide}] (\text{cp}/\mu\text{L}) = \frac{A_{260} \times 50 \times \text{taille du plasmidie (pb)}}{\text{facteur de dilution} \times 650 \text{ (g/mol/pb)}}$$

### 2.2.6. Amplification de l'ADN par PCR

Les amplifications de l'ADN ont été réalisées avec la GoTaq<sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase (Promega). L'ADN cible est dispersé dans un mélange contenant 1  $\mu\text{L}$  de dNTP mix (= 4  $\times$  10 nmoles), 10  $\mu\text{L}$  de tampon [5 $\times$ ] green GoTaq, 3  $\mu\text{L}$  de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0,5  $\mu\text{L}$  de chaque oligonucléotide à 100  $\mu\text{M}$ , 0,2  $\mu\text{L}$  de Taq polymérase (5 U/ $\mu\text{L}$ ) et un volume d'eau ultra-pure (qsp 50  $\mu\text{L}$ ). Les séquences, des différents oligonucléotides utilisés, sont consignées dans les **Tableaux 10, 11, 12 et 13**. Les réactions d'amplification sont réalisées dans des thermocycleurs programmables (MasterCycler<sup>®</sup>, Eppendorf). Pour l'amplification des fragments spécifiques et non spécifiques du gène codant l'ARNr 16S bactérien, la programmation thermique est la suivante : (1) une étape de fusion de 5 min à 95 °C ; (2) 35 cycles d'amplification de 30 sec à 95 °C, 30 sec à 56 °C et 30 sec à 72 °C ; (3) une étape finale d'elongation de l'ADN, 5 min à 72 °C. Les produits d'amplification sont alors séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,7 %.

**Tableau 10. Amorces *Flavobacterium psychrophilum***

Gène	Numéro d'accession	Code	Séquence nucléotidique	Taille ampliat
Gène de détection				
16S rRNA gene	FP0471	Fp_16S1_Fw Fp_16Sint1_Rev	GAGTTGGCATCAACACAC TCCGTGTCTCAGTACCGAG	146 pb

**Tableau 11. Amorces bactériennes universelles**

Gène	Numéro d'accession	Code	Séquence nucléotidique	Taille ampliat
Gène de détection				
16S rRNA gene	CP001396	16S_338_Fw 16S_503_Rev	CTCCTACGGGAGGCAGCA CTGCTGGCACGGAGTTAGC	181 pb

### 2.2.7. Insertion des fragments d'ADN amplifiés par PCR dans le plasmide pGEMT-Easy

Les amplifiats de PCR obtenus avec les couples d'amorces FP\_16S1\_Fw / FP\_16Sint1\_Rev (**Tableau 10**) et 16S\_338\_Fw / 16S\_503\_Rev (**Tableau 11**) sont insérés dans le pGEM-T Easy (Promega) afin de construire respectivement les plasmides pNO2 et pNO10, selon les instructions du fournisseur. Brièvement, un mélange réactionnel [2 µL de produits de PCR ; 5 µL de tampon de ligature [2×] ; 1 µL de vecteur pGEMT Easy (50 ng) ; 1 µL de T4 DNA ligase (3 U/µL) ; 1 µL d'eau ultrapure] est incubé à température ambiante pendant 1 heure. Une fraction des mélanges de ligature (2 µL) est précautionneusement dispersée dans 50 µL d'une suspension d'*E. coli* JM109 fraîchement décongelée. A l'issue d'une période d'incubation de 20 min à la température de la glace fondante, les bactéries sont placées à 42 °C pendant 45 secondes puis refroidies brutalement dans la glace fondante durant 2 minutes. Elles sont ensuite ensemencées dans 950 mL de milieu SOC (**Tableau 4**) à 37 °C sous agitation pendant 90 minutes puis étalées sur boîte de LB solide supplémenté avec l'antibiotique approprié. Après une nuit de croissance à 37 °C, plusieurs colonies sont repiquées dans 5 mL de milieu LB liquide contenant le même antibiotique puis incubées à 37 °C sous agitation pendant 24 heures. La présence de plasmides recombinants, dans les cultures, est contrôlée par PCR.

### 2.2.8. Synthèse de nanoparticules organiques

Des nanoparticules organiques ont été préparées à partir d'acide poly- $\gamma$ -glutamique ( $\gamma$ -PGA) produit par *Bacillus subtilis* et commercialisé par Wako (Japon).

#### Synthèse du copolymère L-Phe- $\gamma$ -PGA

Dans un premier temps, l'apolarité de l'acide poly  $\gamma$  glutamique ( $\gamma$ -PGA) est modifié par l'ajout de L-phénylalanine (L-Phe) en présence de 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (WSC). Brièvement, le  $\gamma$ -PGA (607 mg ; 4,7 mmol) est dissout dans 100 mL d'une solution de NaHCO<sub>3</sub> 100 mM à 4 °C. Le WSC (1,25 g ; 6,5 mmol) est ajouté à la solution sous agitation pendant 5 minutes à la température de la glace fondante. La L-Phe (1,08 g ; 4,7 mmol) est ensuite mélangée à la solution de  $\gamma$ -PGA/WSC. Le mélange réactionnel est maintenu 60 minutes à la température de la glace fondante puis 24 heures à température ambiante. La solution « laiteuse » obtenue est ensuite dialysée contre de l'eau

**Tableau 12. Amorces *Oncorhynchus mykis***

Gène	Numéro d'accession	Code	Séquence nucléotidique	Taille amplifiat
Gène de ménage (calibrateur)				
<i>act-β</i>	AJ223954	Om_ACTB_Fw Om_ACTB_Rv	TGGGGCAGTATGGCTTGTATG CTCTGGCACCCCTAACACACCTCT	165 pb
Réponse au stress				
<i>mt-a</i>	X99395	Om_MTA_Fw Om_MTA_Rv	CATTCGGATAAAGAAGGTAGC GTGATGTCATACACAGGC	240 pb
<i>sod1</i>	AF469663	Om_SOD1_Fw Om_SOD1_Rv	CTGCTTGAAGACCCT CCATTGAGGCCACGACTA	240 pb
Cytokines				
<i>Il-1β</i>	AJ004821	Om_IL1_Fw Om_IL1_Rv	CGTCCCCATTGAGACT GTTTGCAGGCCATCTTAG	350 pb
<i>ifn-γ</i>	AY795563	Om_IFN_Fw Om_IFN_Rv	AAGGGCTGTGATGTGTTCTG TGTACTGAGCGGCATTACCTCC	68 pb
<i>tgf-β</i>	X99303	Om_TGF_Fw Om_TGF_Rv	TCTGAATGAGTGGCTGCAAG GGTTTCCCACAATCACAAAGG	75 pb
Récepteurs cellulaires				
<i>cd8-α</i>	AF178054	Om_CD8_Fw Om_CD8_Rv	ACACCAATGACCACAACCATAAGAG GGGTCCACCTTCCACTTT	74 pb
<i>cd4</i>	AY973028	Om_CD4_Fw Om_CD4_Rv	CATTAGCCTGGGTGGTCAAT CCCTTCTTGACAGGGAGA	89 pb
<i>Mhc2-β</i>	AF115533	Om_MHCII_F Om_MHCII_Rv	TGCCATGCTGATGTGCAG GTCCCTCAGCCAGGTCACT	67 pb
Immuno-globulines				
<i>igm</i>	S63348	Om_IGM_Fw Om_IGM_Rv	CTTGGCTTGTGACGATGAG GGCTAGTGGTGTGAATTGG	72 pb
<i>igt</i>	AY870265	Om_IGT_Fw Om_IGT_Rv	AGCACCAAGGGTGAACCCA GCGGTGGGTTCAGAGTCA	72 pb

dans un boudin à dialyse en cellulose (diamètre d'exclusion de 50 000 Da) pendant 72 heures afin d'éliminer la L-Phe non greffée et le WSC libre. Le dialysat est congelé à -80 °C, lyophilisé et la poudre obtenue ( $\approx 1$  g) est lavée dans 40 mL d'éthanol pur pendant 2 heures. Après une étape de centrifugation ( $1\ 000 \times g$ , 15 min, température ambiante), les traces d'alcool présentes dans le culot, sont évaporées sous pression réduite.

### **Préparations de nanoparticules de $\gamma$ -PGA-L-Phe**

Le  $\gamma$ -PGA-Phe (100 mg) est dissout dans 10 mL de DMSO par des cycles répétés d'agitation et de sonication (24 Watts ; 30 sec). Après dissolution complète du produit, une solution de NaCl 0,3 M est ajoutée volume à volume (500  $\mu$ L : 500  $\mu$ L). Le mélange obtenu est centrifugé ( $14\ 000 \times g$ , 15 min, température ambiante) puis le culot est repris dans 1 mL d'eau ultra-pure. La procédure est répétée 2 fois afin de se débarrasser de toute trace de solvant organique. Les nanoparticules sont alors reprises dans 250  $\mu$ L de PBS et conservées à 4 °C.

## **2.3. Techniques analytiques**

### **2.3.1. Dosage des métaux dans l'eau**

Afin de stabiliser les métaux, l'eau prélevée sur les différents sites est immédiatement acidifiée à 10 % (v/v) avec de l'acide nitrique pur.

Les dosages d'arsenic (As), de cadmium (Cd) et de plomb (Pb) sont réalisés par absorption atomique (M6 Solaar) équipée d'un atomiseur en four graphite (GF95 graphite furnace). Le dosage du zinc (Zn) est réalisé par absorption atomique équipée d'un atomiseur en flamme acétylène/oxygène (Varian SpectrAA 220 FS ; [Zn] > 10  $\mu$ g/L). Les dosages d'aluminium (Al), d'argent (Ag) et de sélénium (Se) sont réalisés par ionisation en torche à plasma couplée à la spectrométrie de masse (ICP-MS ; norme ISO 17294-2) et les dosages d'étain (Sn) et de fer (Fe) ont été réalisés par ionisation en torche à plasma couplée à la spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES ; norme ISO 11885).

**Tableau 13. Amorces *Danio rerio***

<b>Gène</b>	<b>Numéro d'accession</b>	<b>Séquence nucléotidique</b>
Gène de ménage (calibrateur)		
<i>actine β</i>	NM_131031	AAGTGCACGTGGACA GTTTAGGTTGGTCGTTCGTTGA
Métabolisme mitochondrial		
<i>coxI</i>	NC_002333	GGAATACCACGACGGTACTCT AGGGCAGCCGTGTAAT
Stress oxidant		
<i>sod</i>	BC055516	TGAGACACGTCGGAGACC TGCCGATCACTCCACAGG
<i>sodmt</i>	CB923500	TTCAGGGCTCAGGCTGG ATGGCTTAACATAGTCCGGT
Détoxication		
<i>mt1</i>	X97278	CTGCGAATGTGCCAACAGACT GCTGGAGCCACAGGAAT
<i>mt2</i>	AY305851	TGCGAATGCGCCAAGAC GCCCTTACACACCGCAGC
<i>tap</i>	AL672164	GCAAGATAGCGATGGTGGG CGTTGGCTTGCTTGCAG
Apoptose		
<i>bax</i>	AF231015	GGCTATTCAACCAGGGTTCC TGCAGATCACCAATGCTGT
Réparation de l'ADN		
<i>gadd</i>	BC059472	GCTTGTTCGTGTCTTCTGTGG CTTCCCGCATTCAAGCGAT
<i>rad51</i>	BC062849	TGCTGCGTCTCGCTGA GCCTCGGCCTCTGGTAA

### 2.3.2. PCR en temps réel

#### Quantification de *F. psychrophilum*

Les mélanges réactionnels (25 µL) permettant la détection et la quantification du pathogène par la qPCR sont déposés au fond des puits d'une microplaquette de 96 puits. Ils sont constitués de : 12,5 µL de Brillant Blue Syber Green Q-PCR master mix (Agilent technologies), 2 µL du mélange des deux amores (2 µM), 5 µL d'une solution d'ADN cible préparé à partir de tissus de poisson ou d'une suspension bactérienne diluée au 1/10<sup>e</sup> et 5,5 µL d'eau ultra-pure "nucléase-free". La réaction de qPCR est réalisée dans un thermocycleur MX3000p (Agilent technologies) en utilisant la programmation suivante : une première étape de dénaturation de l'ADN (10 min à 96 °C) puis une deuxième étape d'amplification de 40 cycles composés de : 30 sec de dénaturation de l'ADN à 96 °C, 30 sec d'hybridation ADN cible/amores à 56 °C et 30 sec d'extension des amores sur l'ADN cible à 72 °C. A chaque fin de cycle, la mesure de l'intensité de la fluorescence (IF<sub>495</sub>) du mélange réactionnel est enregistrée puis représentée sous forme d'une courbe IF<sub>495</sub>=f(cycles) classiquement de forme sigmoïde. Pour toutes les courbes d'amplification, un seuil d'IF<sub>495</sub> est fixé de façon à ce qu'il coupe la courbe d'amplification au début de la phase exponentielle d'augmentation de fluorescence. Le nombre de cycles correspondant à l'intersection de ce seuil et de chaque courbe d'amplification est appelé "threshold cycle" (C<sub>T</sub>), ou cycle seuil. A l'issue de la qPCR, une troisième étape d'analyse de la température de fusion (Tm) des produits obtenus est réalisée, grâce à l'établissement d'une courbe de fusion des amplifiats, dans un gradient de température de 65 à 95 °C (2 °C/min) et des mesures d'intensité de fluorescence du mélange réactionnel (1 toutes les 10 sec).

Deux couples d'amores sont utilisés pour détecter/quantifier *F. psychrophilum* : un premier couple spécifique de la flavobactérie (Fp\_16S1\_Fw/Fp\_16Sint1\_Rev) et un second, spécifique de toutes les eubactéries (16S\_338\_Fw/16S\_503\_Rev). A partir d'une séquence ADNr 16S de *F. psychrophilum*, ils amplifient deux fragments distincts de 146 et 181 paires de bases. Aussi pour quantifier les cibles présentes dans un échantillon biologique, une copie de l'amplifiat de 146 pb spécifique de *F. psychrophilum* a été insérée dans un plasmide (pGEMT easy vector ; Promega). Le plasmide recombinant obtenu (= pNO2) a été quantifié par mesure de l'absorbance à 260 nm (A<sub>260</sub>), dilué en série au 1/10<sup>e</sup> puis utilisé en triplicata dans le test qPCR afin de créer une gamme d'étalonnage (5 à 5 × 10<sup>8</sup> copies d'ADN 16S/réaction) pour quantifier *F. psychrophilum* dans les échantillons biologiques. De la même



manière, un second plasmide recombinant a été construit avec une copie de fragment de 181 pb de l'ADN 16S spécifique des bactéries afin de créer comme précédemment une gamme d'étalonnage pour évaluer le nombre total des bactéries présentes sur l'échantillon biologique. La spécificité du couple d'amorces [Fp\_16S1\_fw/ Fp\_16Sint1\_rev] vis-à-vis de *F. psychrophilum* est évaluée en calculant un facteur de spécificité pour un même échantillon ne correspondant pas à *F. psychrophilum*:

$$\text{Facteur de spécificité} = \frac{\text{nb de copies d'ADNr 16S sécifiques de } F. \text{psychrophilum}}{\text{nb de copies d'ADNr 16S total}}$$

Ce facteur est égal ou supérieur à 1 lorsqu'un échantillon testé est contaminé uniquement par *F. psychrophilum*; ce facteur tend vers 0 dans le cas d'une contamination par une (des) bactérie(s) distincte(s) de *F. psychrophilum*.

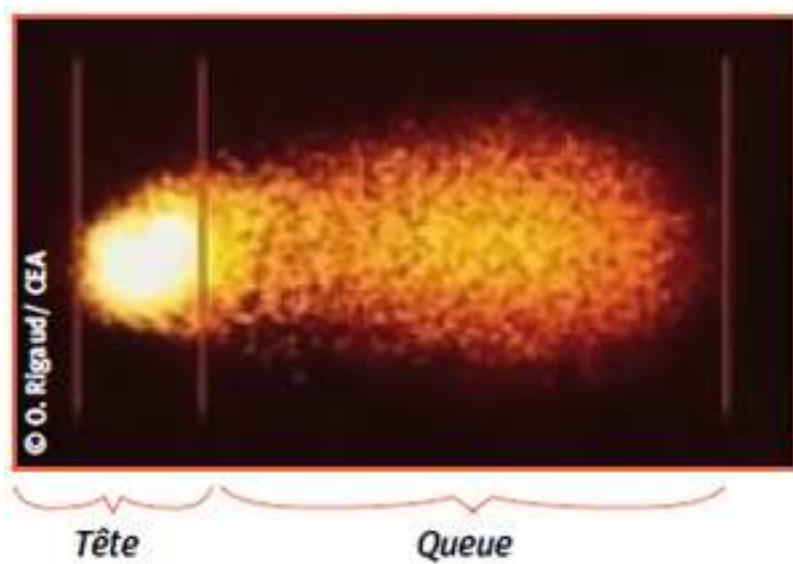
### **Analyse de l'expression génique**

Les amorces utilisées pour la mesure de l'expression des gènes sélectionnés chez la truite et le poisson zèbre sont consignées respectivement dans les **Tableaux 12 et 13**. Le mélange réactionnel de la qPCR est constitué comme précédemment en utilisant 2 µL d'ADN cible, c'est-à-dire d'ADN complémentaire obtenus à partir des ARNm prélevés sur des tissus de poissons ou de bactéries, dilués au ½. La programmation du thermocycleur est identique à celle décrite précédemment, sauf l'étape d'hybridation des ADNc cibles avec les amorces qui est réalisée à 56 °C. La courbe de fusion des produits d'amplification, si elle affiche un seul *T<sub>m</sub>*, permet de s'assurer de la présence d'un seul amplifiat dans le produit de PCR. Le gène, de référence (ou gène de ménage) utilisé code l'actine-β (*act-β*) chez la truite arc-en-ciel. L'expression relative, d'un gène *x* dans un contexte cellulaire soumis à deux conditions environnementales distinctes 1 et 2, est calculée de la manière suivante :

$$\text{Facteur d'expression du gène } x \text{ en condition 1 vs condition 2} = \frac{2^{-\Delta C_T 1}}{2^{-\Delta C_T 2}}$$

$$\text{avec } \Delta C_T = C_T \text{gène } x - C_T \text{gène de ménage}$$

Le gène *x* est surexprimé dans les cellules en condition 1 par rapport à celles en condition 2 lorsque le facteur d'expression est supérieur à 1 et inversement, ce même gène est réprimé si le facteur est inférieur à 1.



**Fig. 8.** Exemple d'image obtenue pour le test des comètes de l'ADN. Le moment Tête-Queue est calculé par le produit de la longueur de la queue avec la fraction d'ADN de la queue par rapport à l'ADN total de la tête plus la queue (mesurée par quantité de fluorescence).

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

La RAPD est une technique dévolue à l'analyse du polymorphisme génétique au sein d'une espèce, mais les conditions d'analyse permettent l'extension de cette technique à l'étude des impacts génotoxiques.

Les amorces utilisées pour la RAPD sont des décamères d'oligonucléotides OPB7 (5'-GGTGACGCAG-3') et OPB11 (5'-GTAGACCCGT-3'). Les PCR en temps réels ont été réalisées avec l'automate Lightcycler (ROCHE) en utilisant les conditions réactionnelles recommandées par le fabricant. Le mélange réactionnel est constitué de 16 ng d'ADN génomique, 2 µL d'amorces (6 µM chacune), et 16 µL de mélange de PCR (LightCycler ® FastStart DNA Master PLUS SYBR Green I, ROCHE). Le protocole de la réaction est le suivant : une étape d'activation de l'enzyme et de dénaturation de l'ADN (95 °C 10 min) ; 50 cycles de PCR : 95 °C, 5 s ; 50 °C, 5 s ; et 72 °C, 30 s. Une analyse, par courbe de fusion thermique, est ensuite réalisée par augmentation progressive de la température de 60 °C à 95 °C ; la fluorescence étant mesurée après chaque transition de température (0,5 °C/sec). Pour chaque réaction de PCR, l'efficacité relative d'hybridation de l'amorce OPB11 (sensible à la contamination au Cd) par rapport à OPB7 (référence) est calculée par la formule suivante :

$$\text{Efficacité relative d'hybridation} = 2^{C_T(\text{OPB7}) - C_T(\text{OPB11})}$$

#### **2.3.3. Test comète**

Dans chaque échantillon de sang, la densité cellulaire est ajustée à  $10^6$  cellules/mL avec du PBS. Ensuite, 75 µL de chaque suspension cellulaire sont mélangés à 75 µL d'agarose bas point de fusion (LMP) à 1 %, pipetés sur une lame de microscope, et couverts par une lamelle. Une fois l'agarose solidifiée, la lamelle a été retirée puis 90 µL de LMP sont ajoutés sur la première couche et solidifiés dans la glace. Les lames sont alors immergées dans un tampon NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris-HCl 10 mM, DMSO à 10 %, Triton X-100 à 1 %, pH 10 durant 1 heure à 4°C. L'ADN est alors équilibré 30 minutes dans une solution d'électrophorèse alcaline (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, pH>13). L'électrophorèse est réalisée sous un courant de 0,7 V/cm et 300 mA durant 20 min. Les lamelles sont finalement colorées avec 50 µL de bromure d'éthidium à 20 µg/mL avant d'être observées au microscope à épi-fluorescence (Zeiss) équipé d'un filtre d'excitation de 350-390 nm et d'émission de 456

**Tableau 14. Composition des solutions constituant les gels de polyacrylamide pour un gel moyen de 80 mm x 60 mm x 2mm**

	<b>Gel de concentration</b>	<b>Gel de séparation</b>
Sol. polyacrylamide :		
Acrylamide 37,5 % p/v	4,8 % soit 300 µL	10 % soit 1,25 mL
N, N' méthylènebisacrylamide 1 % p/v		
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	625 µL	-
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	-	1,25 mL
H <sub>2</sub> O, qsp	1,5 mL	2,5 mL
SDS 10 % (p/v)	25 µL	50 µL
APS 10 % (p/v)	7,5 µL	32,5 µL
TEMED	4,5 µL	7,5 µL

nm. Les comètes (**Fig. 8**) sont analysées avec le logiciel Explora Nova Comet Assay donnant le moment Tête-Queue (produit de la longueur de la queue avec la fraction d'ADN de la queue par rapport à l'ADN total de la tête plus la queue).

#### 2.3.4. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry *et al.* (1951). Dans le cas des protéines membranaires, les extraits sont préalablement dilués dans du SDS à 0,1 % (p/v) afin de maintenir les molécules en solution (Markwell *et al.*, 1978). Le contenu polypeptidique des échantillons est évalué par des mesures d'absorbance à 750 nm par rapport à une gamme étalon de sérum albumine bovine (0 à 40 µg de protéines) réalisée dans les mêmes conditions expérimentales.

#### 2.3.5. Electrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE)

Les protéines sont séparées en fonction de leur masse moléculaire apparente dans des gels de polyacrylamide contenant du SDS selon la technique décrite par Laemmli (1970). La composition des gels est détaillée dans le (**Tableau 14**). Les concentrations en acrylamide et en bis-acrylamide sont ajustées en fonction de la taille des protéines à séparer.

Les échantillons sont dilués, volume à volume, dans un cocktail "échantillon de charge" constitué de tampon Tris 60 mM-HCl (pH 6,8), de SDS à 1 % (p/v), de glycérol à 10 % (v/v), de bleu de bromophénol à 0,01 %, (p/v), en présence ou non de β-mercaptopéthanol à 1 % (v/v) comme agent réducteur des ponts disulfures des protéines. Les échantillons sont chauffés pendant 5 min à 100 °C. L'électrophorèse est réalisée en tampon Laemmli (Tris 25 mM-glycine 192 mM, pH 8,3 ; SDS 0,1 %, p/v) sous intensité de courant constante (25 mA/gel) pendant 2 h. La masse moléculaire apparente des protéines est évaluée par comparaison avec la migration de marqueurs de masse moléculaire LMW SDS-MARKER (Amersham Biosciences).

#### 2.3.6. Electrophorèse bidimensionnelle

La méthode utilisée est celle décrite initialement par O'Farrell (1975). Les protéines membranaires sont séparées dans une première dimension selon leur point isoélectrique dans un gradient de pH formé par des ampholytes. La seconde séparation est réalisée dans un gel d'électrophorèse classique SDS-PAGE.

**Tableau 15. Composition des solutions nécessaires à l'analyse protéomique**

	<b>Tampon de réhydratation</b>	<b>Tampon d'équilibration 1</b>	<b>Tampon d'équilibration 2</b>
Thiourée	4,2 g	-	-
Urée	11,6 g	180 g	180 g
CHAPS	1,11 g	-	-
IPG Buffer (Amersham)	314,7 µl	-	-
Tris	-	3,025 g	3,025 g
SDS	-	10 g	10 g
Glycérol	-	150 mL	150 mL
DDT 2M		250 µL	-
Iodoacétamide		-	231,2 mg
Bleue de bromophénol	10 mg	-	-
Eau qsp	27,75 mL	500 mL	500 mL

L'analyse 2-D des protéines membranaires est facilitée lorsque les membranes externes sont préparées en utilisant le kit ReadyPrep 2-D cleanup (Bio-Rad). Brièvement, le culot membranaire (300 µg de protéines) est repris dans 460 µL de tampon de réhydratation (**Tableau 15**). La solution protéique est déposée sur une bande (24 cm ; gradient non linéaire de pH 3-10 ; Invitrogen) pendant 16 h à température ambiante. A l'issue de cette étape de réhydratation, les protéines sont séparées par isoélectrofocalisation dans l'appareil IPGphor™ electrophoresis unit (Pharmacia Biotech) en utilisant les paramètres électriques suivants : (1) 500 Volts, 1 h ; (2) 1.000 Volts, 1 h ; (3) 8.000 Volts, 1 h. A la fin de cette première séparation, les bandes sont incubées successivement dans deux bains d'équilibration (tampons d'équilibration 1 puis 2 ; 15 min ; température ambiante) (**Tableau 15**). Chaque bande est ensuite déposée au-dessus d'un gel de polyacrylamide (20 × 20 × 1 cm) puis fixée par addition de 400 µL d'une solution d'agarose à 0,5 % afin de réaliser la seconde séparation. L'électrophorèse est réalisée en tampon Laemmli sous tension constante de 200 V pendant environ 6 h dans l'appareil PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad). Le poids moléculaire des protéines est évalué, par comparaison, avec la migration d'un mélange de standards de masse moléculaire (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad).

### 2.3.7. Révélation des protéines

#### *Coloration des protéines au Bleu de Coomassie R-250*

Après migration dans les gels de polyacrylamide-SDS, les protéines sont fixées et révélées par un mélange d'acide acétique/méthanol/eau (7/50/43, v/v/v) contenant du bleu de Coomassie R-250 à 0,05 % (p/v). L'excès de colorant est éliminé par des lavages successifs des gels dans un mélange d'acide acétique/méthanol/eau (1/1/8, v/v/v).

#### *Coloration des protéines au Bleu de Coomassie G-250*

Dans le cas où la détection des protéines est suivie d'une analyse par spectrométrie de masse, les protéines sont colorées par le bleu de Coomassie G-250 en raison de sa grande sensibilité (seuil de sensibilité de la coloration 8 à 10 ng de protéines). Le gel est incubé pendant une nuit sous agitation dans un bain de coloration constitué de sulfate d'ammonium à 10 % (p/v), d'acide orthophosphorique à 2,5 % (v/v), d'éthanol à 20 % (v/v) et de bleu de Coomassie G-250 à 0,1 % (p/v). L'étape de décoloration est renouvelée plusieurs fois dans des bains d'acide acétique à 5 % (v/v).



### **Coloration des protéines au nitrate d'argent**

La méthode de coloration au nitrate d'argent est celle décrite par Tunon et Johansson (1984). Le gel contenant les protéines séparées est incubé successivement dans deux bains de pré-fixation (1 h, pré-fixateur 1, acide acétique/méthanol/eau, 7/50/43, v/v/v ; 1 h, pré-fixateur 2, acide acétique/méthanol/eau, 1/1/90, v/v/v) puis 30 min dans un bain de fixation (glutaraldéhyde à 8,3 %). Après trois rinçages de 15 min dans de l'eau distillée, le gel est placé à l'obscurité dans une solution d'éthanol à 20 % (v/v) contenant le nitrate d'argent ammoniacal ( $\text{AgNO}_3$  14,7 mM, NaOH 6,25 mM,  $\text{NH}_4\text{OH}$  66,8 mM). Le gel est ensuite rincé trois fois dans la solution d'éthanol à 20 % et les protéines sont révélées dans un bain d'éthanol à 20 % en présence de formaldéhyde 13,3 mM et d'acide citrique 120 mM. L'arrêt de la coloration est assuré par transfert du gel dans un dernier bain (acide acétique 175 mM, éthanolamine 8,35 mM, éthanol 20 %, v/v).

### **Conservation des gels colorés**

Après révélation des protéines, les gels de polyacrylamide sont conservés dans une solution d'éthanol à 20 % avant d'être déshydratés entre deux feuilles de cellophane selon la technique décrite par Wallevik et Jensenius (1982).

#### **2.3.8. Détection des protéines par immunoempreinte**

Les protéines, séparées par SDS-PAGE, sont électrotransférées sur membrane de nitrocellulose 0,45 µm (Bio-Rad) dans du tampon de transfert (Tris-HCl 25 mM-glycine 192 mM ; méthanol 20 % v/v ; SDS 0,1 %, v/v) (Towbin et al., 1979) en utilisant l'appareil de transfert (Mini Trans-Blot® Cell, Bio-Rad) pendant 2 h à 70 V constants. L'efficacité du transfert sur membrane est vérifiée par coloration réversible des protéines au rouge Ponceau S à 0,5 % (p/v) dans une solution d'acide trichloroacétique à 8 % (p/v) (Salinovich et Montelaro, 1986). Le colorant est éliminé par des rinçages successifs avec de l'eau distillée puis du PBS contenant du Tween 20 à 0,05 %.

Les protéines transférées sont révélées par la méthode du double marquage immunologique réalisée à température ambiante sous faible agitation. Les sites d'adsorption libres de la membrane de nitrocellulose sont saturés avec le tampon de saturation (30 min ; PBS-Tween 20 0,05 %, v/v ; BSA 1 % p/v). Le premier marquage est effectué en présence



d'anticorps primaires de lapin (ou de truite) dilués dans du tampon de saturation (dilution : 1/500e). Après quatre lavages de 10 min dans du tampon de PBS-Tween 20, la membrane est incubée 45 min avec les anticorps secondaires (anticorps de porc anti-IgG de lapin couplés à la phosphatase alcaline, DAKO) dilués au 1/2 000<sup>e</sup> dans le tampon PBS-Tween 20. L'excès d'anticorps est éliminé par quatre lavages de 15 min dans le tampon PBS-Tween 20. Les immunoglobulines fixées sont révélées à l'aide d'un mélange réactionnel de BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphate p-Toluidine Salt, Sigma) et de NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride, Sigma). Enfin, la révélation est arrêtée par transfert de l'immuno-empreinte dans une solution d'EDTA 5 mM. Lorsque les sérums de truites (dilution 1/200<sup>e</sup> ou 1/2 000<sup>e</sup>) sont utilisés comme anticorps primaires, une incubation intermédiaire est réalisée avec un sérum de lapin dirigé contre des immunoglobulines de truite (dilution 1/2 000<sup>e</sup> ; source : INRA).

### 2.3.9. Dosages des anticorps anti-*F. psychrophilum*

La concentration en anticorps dirigés contre *F. psychrophilum* circulant dans le sang des truites arc-en-ciel, est estimée par dosage ELISA (« Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay » ou dosage d'immunoabsorption par enzyme liée) dans des microplaques "96 puits". Le sang total des poissons est collecté, à l'aide d'une seringue héparinée, par prélèvement dans la veine caudale. Le sérum est récupéré par centrifugation du sang (1 000 × g, 10 min, 4 °C).

Chaque puits de la microplaqué ELISA est rempli d'une suspension d'enveloppes de *F. psychrophilum* à 10 µg de protéines/mL dans du tampon carbonate-Na 50 mM (pH 9,6) (1 µg de protéines/puits) puis incubé pendant une nuit à 4 °C afin de parfaire la fixation des antigènes au fond des puits. Les microplaques sont vidées et les puits lavés avec du PBS-Tween 20 à 0,05 % (3 cycles de lavage). Le premier marquage immunologique est réalisé avec les sérums de truites préalablement dilués successivement en série au ½ dans du PBS-Tween 20 (une dilution d'un sérum/puits). A l'issue d'une période de 3 h d'incubation à température ambiante suivie de trois lavages successifs avec du tampon PBS-Tween 20, un deuxième marquage immunologique est effectué en présence d'anticorps de lapin dirigés contre les immunoglobulines de truite (dilution : 1/2 000<sup>e</sup> ; source : INRA). Après une heure d'incubation à température ambiante et un cycle de lavage, le troisième marquage immunologique s'effectue en présence d'IgG de porc, dirigé contre les anticorps de lapin, couplées avec la peroxydase de raifort (dilution : 1/2 000<sup>e</sup> ; source : Dako). Les IgG fixées sont révélées à l'aide d'un mélange réactionnel constitué d'O-phenylene-diamine dihydrochloride (OPD) 5 mM, d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2,5 mM dans un tampon Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M-acide



critique 0,1 M (pH 5,0). La réaction enzymatique est arrêtée au bout de 30 minutes à température ambiante par addition d' $H_2SO_4$  4 M (50  $\mu L$ /puits). L'intensité de la coloration jaune observée est lue par mesure absorbance à 490 nm ( $A_{490}$ ). Le titre relatif en anticorps anti-*F. psychrophilum*, attribué à chaque sérum testé, est obtenu en multipliant (1) le facteur de dilution le plus fort dudit sérum pour lequel l' $A_{490}$  devient inférieure à 0,5 par (2) la valeur de l'absorbance lue.

### 2.3.10. Séquençage protéique

Après séparation des protéines par SDS-PAGE, les bandes, correspondant aux protéines d'intérêt observées après coloration du gel, sont excisées puis préparées pour un séquençage *de novo*. Les pièces de gel sont lavées successivement dans un mélange eau/ acide acétique/méthanol (47,5 / 47,5 / 5) et d'acétonitrile puis séchées sous vide. Après une étape de digestion enzymatique (trypsine 8 ng/ $\mu L$  dans  $NH_4HCO_3$  50 mM) et de lavages, les peptides résultants sont analysés par chromatographie capillaire (C18 PepMap column, 75- $\mu m$  de diamètre interne  $\times$  15 cm, LC Packings) couplée à la spectrométrie de masse (nanospray LCQ ion trap, ThermoFinnigan). Chaque spectre MS/MS obtenu est analysé par le programme DeNovoX sequencing (ThermoFinnigan). Les séquences, de taille supérieure à quatre acides aminés correspondant respectivement à une probabilité absolue et relative supérieure à 20 % et 75 %, sont sélectionnées pour des analyses ultérieures. Les spectres correspondant sont vérifiés manuellement et une quinzaine de séquences peptidiques sont finalement obtenues.

Grâce à la mise à disposition de la banque protéique de *F. psychrophilum* (2 432 entrées), les spectres MS/MS obtenus comme précédemment ont permis d'identifier un certain nombre de protéines de la membrane externe. La masse des peptides issus de l'hydrolyse enzymatique est comparée à celle des peptides déduits de l'analyse *in silico*. Chaque identification de protéines est sous-tendue par la caractérisation d'au moins deux peptides (Lasserre *et al.*, 2006).

### 2.3.11. Analyse par RMN du proton

Pour évaluer l'efficacité du greffage des résidus de phénylalanine sur le  $\gamma$ -PGA, des analyses, par résonance magnétique du proton sur le PGA, sont réalisées sur les réactifs initiaux et sur le produit final. Les échantillons (10 mg de produit à tester) sont dilués dans 300  $\mu L$  de  $D_2O$  puis analysés par un spectromètre Burker Avance DPX 400 à 23 °C (400



MHz). Ce travail d'analyse n'a pu se réaliser qu'avec l'appui technique de Michèle Schappacher de l'ENSCPB.

### 2.3.12. Microscopie électronique

La suspension de nanoparticules est diluée au 1/100<sup>e</sup> dans de l'eau ou de l'éthanol absolu. Une goutte ( $\approx 5 \mu\text{L}$ ) est adsorbée sur la grille en cuivre collodionnée/carbonée. Après séchage à température ambiante, les particules sont contrastées négativement avec une solution d'acétate d'uranyle à 2 % (p/v) pendant 30 secondes. L'excès de contrastant est éliminé par trois lavages avec de l'eau distillée. Les observations sont réalisées au microscope électronique à transmission Philips CM 120 de CBMN (Chimie et Biologie des Membranes et de Nanoobjets, UMR 5248) avec l'aide technique d'Anthony Désert (Doctorant - ICMCB).

## 2.4. Expression des résultats et analyses statistiques

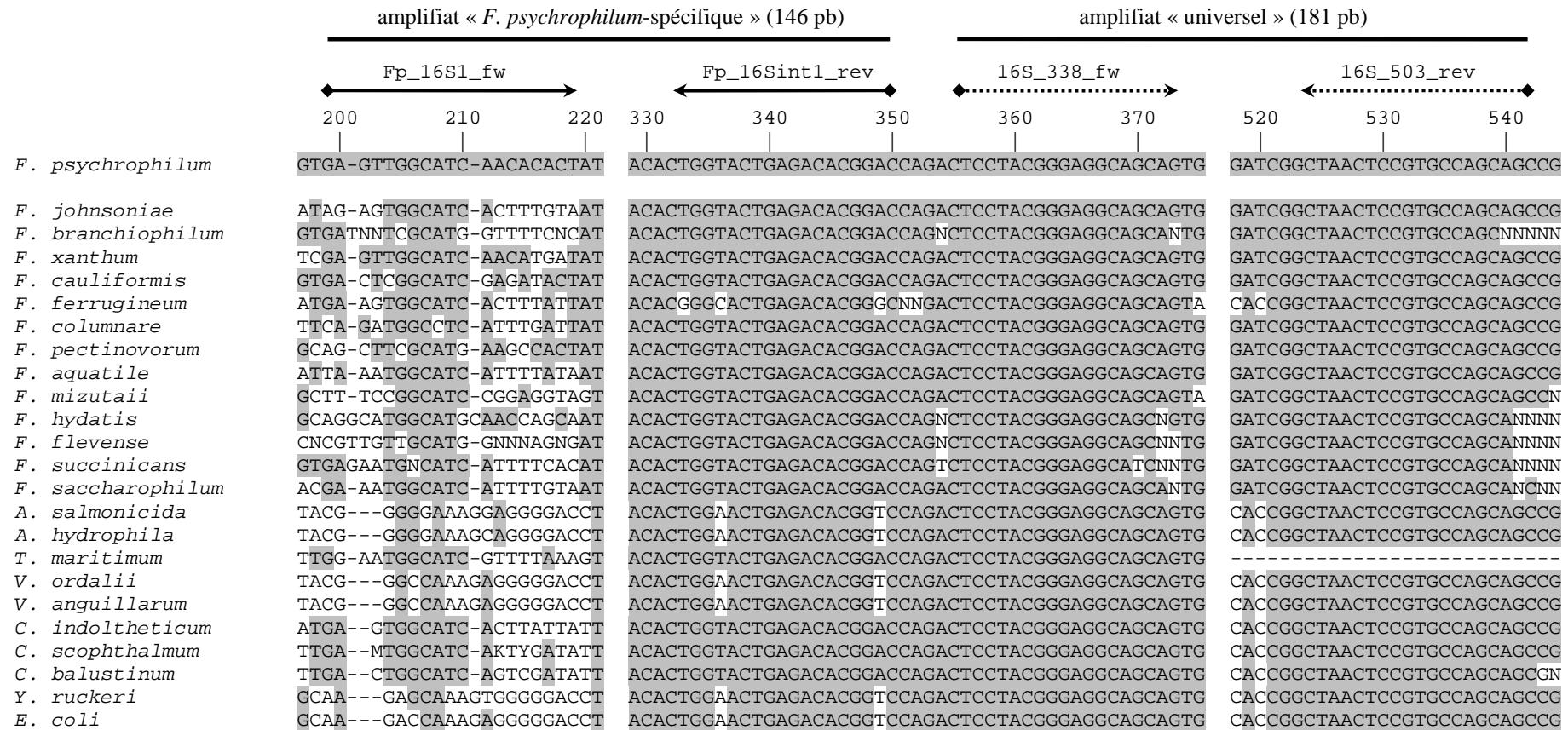
Les comparaisons de séquences nucléotidiques avec les banques de données sont réalisées en utilisant les algorithmes BLAST (Altschul *et al.*, 1990) et FASTA (Pearson, 1990). Les alignements multiples des séquences nucléotidiques et protéiques sont effectués à l'aide du programme ClustalW (Thompson *et al.*, 1994).

Différents programmes sont utilisés pour analyser les séquences protéiques. La méthode de Kyte et Doolittle (1982) a permis d'estimer l'hydrophobicité des protéines, les programmes TMpred et PSORTb v.2.0 (Gardy *et al.*, 2005) de prédire le nombre et l'orientation des domaines transmembranaires et la localisation finale de la molécule, respectivement. La recherche de peptide signal est réalisée en utilisant les programmes LipoP SignalP 3.0 (Nielsen *et al.*, 1997 ; Bendtsen *et al.*, 2004). Des recherches d'homologies protéiques sont effectuées dans les banques de données SWISS-PROT avec les serveurs EMBL BLAST et EMBL FASTA.

Les différences significatives, des niveaux d'expression des gènes, des titres en anticorps ou des titres bactériens, sont déterminées en utilisant le test de comparaison de moyennes non paramétrique de Mann & Whitney ou test - U grâce au logiciel R (R Development Core Team, 2008).



### **3. Détection de *Flavobacterium psychrophilum***



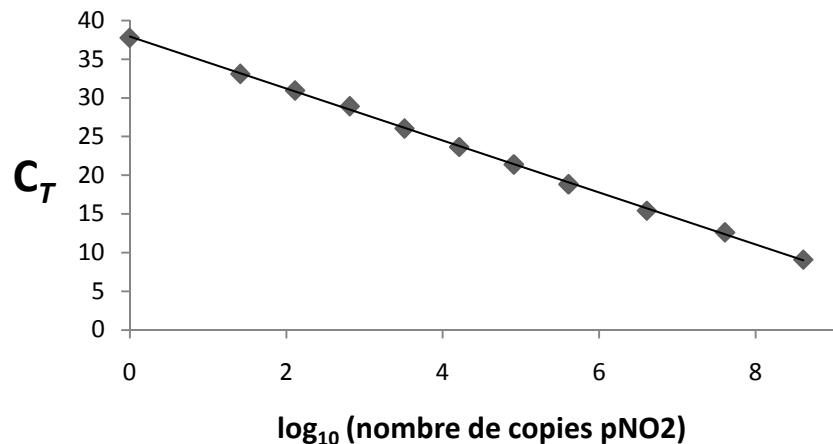
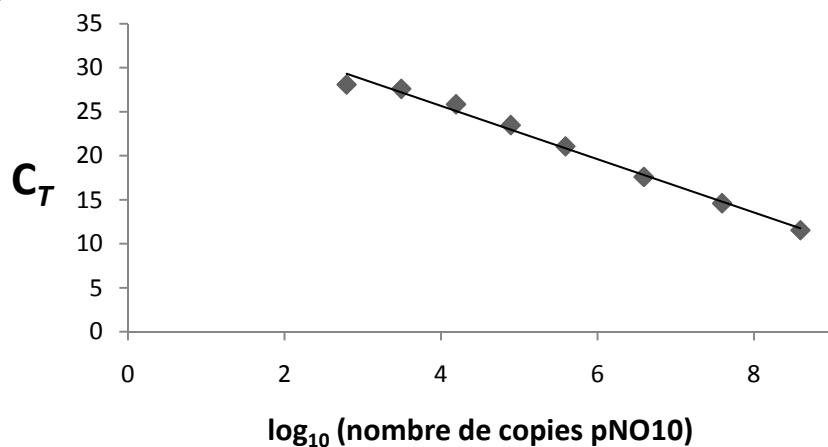
**Fig. 9.** Analyse comparative de la séquence d'ADNr 16S de *F. psychrophilum* JIP02/86 avec celles d'autres flavobactéries ou autres pathogènes de poissons. Les amores permettant d'amplifier le segment « *F. psychrophilum*-spécifique » sont indiquées par deux flèches en trait gras ; celles qui amplifient le segment « universel » marquées par deux flèches en trait pointillé. Les lettres grisées mettent en évidence les bases de l'ADNr 16S de *F. psychrophilum* JIP02/86 conservées dans les différents gènes analysés.

### 3.1. Introduction

On retrouve aujourd’hui *F. psychrophilum* dans toutes les régions pratiquant la salmoniculture (Europe, Amérique, Asie du Nord-Est et Océanie). La suspicion d’un transfert vertical (présence de la bactérie *in ovo*) incriminerait le commerce international des œufs dans l’essaimage fulgurant de la bactérie. Dans un premier temps, le diagnostic de la flavobactériose peut être réalisé par observation des signes de la maladie. Malheureusement, le bilan clinique traduit souvent un stade avancé des dommages causés par l’agent pathogène, stade auquel aucun traitement n’est efficace. De plus, la confirmation du diagnostic par des examens de laboratoire est nécessaire. Il s’agit en particulier d’isoler *F. psychrophilum* sur boîte de Petri et/ou de réaliser des observations au microscope photonique à partir des organes prélevés. L’observation de bacilles fins et flexueux, dans la rate ou parfois le rein, ainsi que l’examen sur gélose de colonies jaunes convexes, apparaissant au bout de 3 jours, après incubation des boîtes à une température de 15-20 °C, permettent de renforcer la suspicion (Holt *et al.* 1993).

D’autres méthodes complémentaires permettent l’identification de *F. psychrophilum*. Elles incluent les méthodes immunologiques : l’immunohistochimie (Evensen and Lorenzen 1996, 1997), l’immunofluorescence (Lorenzen and karas 1992; Amita *et al.* 2000) ou encore l’ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Rangdale and Way 1995; Mata and Santos 2001; Lindstrom *et al.* 2009). Cette dernière technique est efficace mais exige que les sérum de truite, prélevés et testés pour la présence en anticorps anti-*F. psychrophilum*, aient été préalablement épuisés avec des cellules de *F. columnare* afin d’éviter les réactions croisées.

L’inadaptation des techniques conventionnelles en routine a conduit au développement de techniques de PCR afin de détecter directement un fragment du génome de *F. psychrophilum* à partir d’échantillons de poissons. Les technologies de PCR conventionnelles ou de PCR-nichée ("nested-PCR") ont été mises au point pour détecter directement l’ADNr 16S de *F. psychrophilum* (Urdaci *et al.* 1998; Cepeda and Santos 2000; Wiklund *et al.* 2000; Baliarda *et al.* 2002). Ces méthodes permettent la pose d’un diagnostic d’infection au mieux 24 à 48 h après le prélèvement d’animaux contaminés. Aussi, nous avons cherché à proposer une méthode de PCR quantitative (qPCR) qui permet en moins de trois heures de détecter et

**A****B**

**Fig. 10.** Courbes de calibration de la PCR quantitative pour détecter et quantifier spécifiquement (ou non) *F. psychrophilum*. Des nombres de copies croissants du plasmide qui porte un segment d'ADNr 16S de « *F. psychrophilum*-spécifique » (pNO2 ; A) ou « universel » (pNO10 ; B) sont analysés par PCR quantitative en présence respectivement des amores [Fp\_16S1\_fw ; Fp\_16Sint1\_rev] ou [16S\_338\_fw ; 16S\_503\_rev].

### *3. Détection de Flavobacterium psychrophilum*

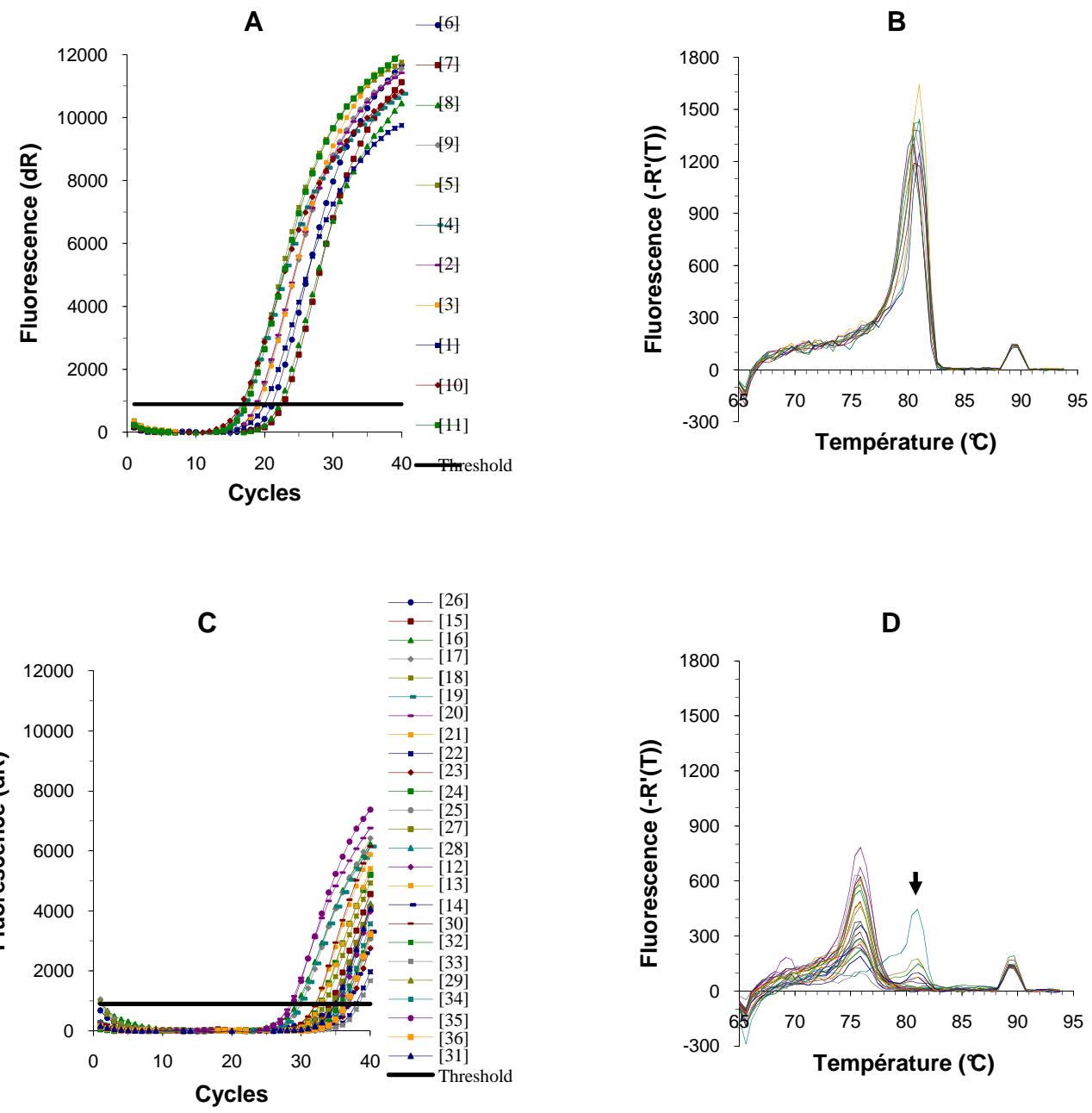
de quantifier un nombre de copies du gène codant l'ARNr 16S (ADNr 16S) de la bactérie dans les tissus du poisson. La séquence d'ADNr 16S présente en 6 copies dans le chromosome de *F. psychrophilum* (Duchaud *et al.* 2007) apparaît comme une cible de choix pour l'amplification tout en augmentant le seuil de sensibilité lors de la détection.

#### **3.2. Résultats et Discussion**

##### **Sélection *in silico* de deux couples d'amorces et PCR quantitative**

Il s'agissait ici de définir deux couples d'amorces permettant de détecter et quantifier (i) spécifiquement *F. psychrophilum* ou (ii) l'ensemble des microorganismes présents dans un échantillon biologique. Pour cela, l'alignement des séquences d'ADNr 16S de différents microorganismes (flavobactéries non-*psychrophilum* et autres pathogènes de poissons) avec celle de *F. psychrophilum* JIP02/86 a révélé l'existence de deux régions : une première hautement variable (spécifique) et une seconde extrêmement conservée (**Fig. 9**). A partir de cette observation, nous avons défini deux couples d'amorces [Fp\_16S1\_Fw ; Fp\_16Sint1\_Rev] et [16S\_338\_Fw ; 16S\_503\_Rev] qui permettent l'amplification « spécifique » de l'ADNr 16S de *F. psychrophilum* ou « universelle » de la plupart des autres bactéries, dont *F. psychrophilum*.

Des standards de quantification des copies du segment spécifique de *F. psychrophilum* ou du segment « universel » aux bactéries ont été créés à partir des deux amplifiats obtenus avec les deux couples d'amorces (respectivement 146 et 181 paires de bases). Une copie de chacun des deux amplifiats a été insérée dans deux vecteurs de clonage distincts (pGEMt). Les préparations, des deux plasmides recombinants obtenus, ont été dosées par spectrophotométrie UV, diluées en série (au 1/10<sup>e</sup> pour les fortes concentrations, puis au 1/5<sup>e</sup> pour les concentrations les plus faibles) puis testées par PCR quantitative : pNO2 (1 copie d'ADNr 16S *F. psychrophilum*-spécifique/plasmide) de 5 à 4 × 10<sup>8</sup> copies par réaction et pNO10 (1 copie d'ADNr 16S « universel »/plasmide) de 624 à 4 × 10<sup>8</sup> copies par réaction (**Fig. 10A & 9B**, respectivement). Les courbes obtenues montrent une bonne linéarité entre le logarithme du nombre de copies d'ADNr 16S et le cycle seuil de la PCR. La PCR quantitative, en présence des amorces *F. psychrophilum*-spécifiques, révèle un seuil de sensibilité évalué à 4 copies de l'ADNr 16S, soit à moins de une cellule de *F. psychrophilum* par essai en raison de la présence de six copies du gène de l'ARNr 16S dans le génome de *F. psychrophilum* (Duchaud *et al.*, 2007). La faible sensibilité de la PCR quantitative avec les



**Fig. 11.** Détection et dosage de *F. psychrophilum* par PCR quantitative. Les échantillons biologiques provenaient de différentes souches de *F. psychrophilum* (A) ou de souches de bactéries non-*F. psychrophilum* (C). Les courbes A et C représentent l'intensité de la fluorescence mesurée en fonction du nombre de cycles pour chacune des souches bactériennes testées en présence du couple d'amorces spécifiques de *F. psychrophilum*. Les courbes de fusion (B et D) des amplifiats obtenus (A et C, respectivement) sont représentées comme la dérivée première de l'intensité de fluorescence des produits d'amplification en fonction de la température.

amorces « universelles » (624 copies d'ADNr 16S/essai) est liée à la capacité de telles amorces à se lier à toutes traces d'ADN bactérien contaminant sans spécificité aucune.

#### Test de spécificité, profil d'amplification et courbes de dissociation

Différentes suspensions bactériennes (*F. psychrophilum*, autres flavobactéries, autres pathogènes) ont été testées par PCR quantitative afin de valider la spécificité de la méthode pour détecter *F. psychrophilum* mais également le seuil de détection (**Fig. 11**). Avec toutes les souches de *F. psychrophilum*, les valeurs de  $C_T$  enregistrées varient de 17 à 24 en fonction des souches (**Fig. 11A**). L'analyse des courbes de fusion révèle une grande homogénéité dans la détermination de la température de fusion des amplifiats obtenus, des valeurs centrées sur une température de  $80,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,6$  (**Fig. 11B**). La situation est totalement différente en présence de brins matricés constitués par les souches bactériennes autres que *F. psychrophilum*. Les valeurs de  $C_T$  observées sont supérieures à 28,5, voire pour certaines, proches de celle obtenue pour le témoin négatif ( $C_T$  « eau » = 36,8) (**Fig. 11C**). De même, les températures de fusion observées pour la plupart des amplifiats sont différentes ( $T_m \approx 75,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) de celle du segment spécifique de l'ADNr 16S de *F. psychrophilum* (**Fig. 11D**). Toutefois, un  $T_m$  de  $81,03\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,04$  a été mesuré pour les amplifiats obtenus avec certaines souches bactériennes autres que *F. psychrophilum* (**Fig. 11D**, flèche), bien que les valeurs de  $C_T$  observées ( $35,47 \pm 0,39$ ) soient supérieures à celles attendues pour *F. psychrophilum*. Afin d'identifier d'éventuelles amplifications aspécifiques, nous avons calculé, pour chaque bactérie testée, un facteur de spécificité : nombre de copies d'ADNr 16S spécifiques de *F. psychrophilum* vs nombre de copies d'ADNr 16S obtenues avec les amorce universelles. Ce rapport est égal à zéro pour les bactéries autres que *F. psychrophilum* ou, égal ou supérieur à 1 pour les différentes souches de *F. psychrophilum*. Les facteurs de spécificité obtenus, pour des souches de *Bacillus megaterium* ( $8 \times 10^{-4}$ ), *Flavobacterium columnare* ( $5 \times 10^{-4}$ ), *Flavobacterium branchiophilum* ( $35 \times 10^{-6}$ ) et *Shewanella putrefaciens* ( $2 \times 10^{-6}$ ), correspondent respectivement à moins de 122, 64, 4 ou 0,4 copies d'ADNr 16S spécifiques de *F. psychrophilum* pour 100 000 copies de gène d'ARNr 16S par réaction de PCR quantitative. A l'évidence, la méthode, que nous proposons, permet bien de discriminer une culture de *F. psychrophilum* d'un échantillon bactérien contaminé à l'état de trace par *F. psychrophilum*.

*3. Détection de *Flavobacterium psychrophilum**

### *3. Détection de Flavobacterium psychrophilum*

#### ***Application de la méthode sur des échantillons de poisson***

Des tissus (peau, muscle et branchies) de truites arc-en-ciel non malades ont été artificiellement infectés avec une quantité connue de *F. psychrophilum*, ( $38 \times 10^3$  cellules/mg de tissus) afin de s'assurer de la capacité de la méthode proposée à détecter la flavobactéries *in situ*. Aucune différence statistique n'a été trouvée entre la quantité déposée et les concentrations calculées dans les différents tissus de poisson. Cette observation indique, sans ambiguïté, que la méthode qPCR que nous proposons permet de détecter quantitativement *F. psychrophilum*, à partir des tissus de poissons et que le protocole permettant la préparation d'ADN matrice est suffisant et efficace pour éliminer les éventuels inhibiteurs de PCR. Plus intéressant, l'analyse des tissus témoins (non dopés avec *F. psychrophilum*) révèle la présence faible mais réelle de la flavobactéries (< 2 cellules/mg de tissus) indiquant que les poissons apparemment sains sont en réalité des porteurs sains de *F. psychrophilum*. La charge bactérienne retrouvée chez les poissons malades est de même ordre de grandeur que celle qui a été utilisée pour doper les tissus sains.

Pour résumer, la PCR quantitative, développée ici, est un outil de détection efficace de *F. psychrophilum* qui pourrait trouver sa place dans les laboratoires d'analyses vétérinaires afin de poser un diagnostic précoce de la flavobactériose en raison de sa sensibilité.

*3. Détection de *Flavobacterium psychrophilum**

## **Quantification of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues by qPCR**

**Nicolas Orioux<sup>1</sup>, Jean-Paul Bourdineaud<sup>1</sup>, Diane-Gaëlle Douet<sup>2</sup>, Patrick Daniel<sup>3</sup> and Michel Le Hénaff<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Université Bordeaux, CNRS UMR ‘Environnements et Paléoenvironnements Océaniques’, Place du Dr. Peyneau, F-33120 Arcachon, France

<sup>2</sup> Groupement de Défense Sanitaire Aquacole d’Aquitaine ou<sup>3</sup> Laboratoire Départemental des Landes, 1 rue Marcel David - BP 219, F-40004 Mont de Marsan Cedex, France

Running title: *Flavobacterium psychrophilum* quantification by qPCR

Corresponding author: M. Le Hénaff, Université Bordeaux, CNRS UMR 5805 EPOC, Place du Dr. Peyneau, Arcachon, F-33120, France (e-mail: m-lehenaff@enitab.fr)

Article soumis à *Journal of Fish Disease*

*3. Détection de *Flavobacterium psychrophilum**

**Abstract**

Aims: This study focused on the development of a novel strategy for rapid and sensitive detection of *Flavobacterium psychrophilum* (the etiological agent of bacterial cold-water disease and rainbow trout fry syndrome in salmonid fish worldwide).

Methods and Results: A qPCR assay was developed to detect and quantify the 16S rRNA gene copies of *F. psychrophilum*. A set of *F. psychrophilum*-specific primers based on 16S rRNA gene sequences was designed and validated for specific detection and quantification of DNA isolated from representative strains of *F. psychrophilum*. The qPCR assay exhibited a high specificity for the 16S rRNA gene of *F. psychrophilum* but not for other *Flavobacterium* species or other bacteria including fish pathogens. A good correlation was found between cycle threshold ( $C_T$ ) and gene copy number and the assay detected the *F. psychrophilum* 16S rRNA gene copies in a wide range of concentrations from  $4 \times 10^8$  down to 4 copies per reaction. This qPCR-based method proved to be useful in the quantification of the *F. psychrophilum* titer presents within organs dissected out from diseased fish.

Conclusions: Since the *F. psychrophilum* genome contains 6 copies of the 16S rRNA gene, we could infer a limit of detection corresponding to 0.7 bacteria per reaction, corresponding to 28 bacteria per fish tissue sample, and therefore 0.7 flavobacteria per mg of tissue (for sample weighing 40 mg).

Significance and Impact of the Study: The qPCR assay reported here could be a useful tool for veterinary diagnostic laboratories to quantify *F. psychrophilum* cell number in fish tissues at early stage of infection.

Keywords: bacteria quantification, *Flavobacterium psychrophilum*, qPCR, salmonid fish.

*3. Détection de *Flavobacterium psychrophilum**

## Introduction

*Flavobacterium psychrophilum* (syn. *Cytophaga psychrophila* or *Flexibacter psychrophilus*) belongs to the family *Flavobacteriaceae* in the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) phylum (Bernardet and Nakagawa 2003; Bernardet and Bowman 2006). *F. psychrophilum* is the etiologic agent of ‘rainbow trout fry syndrome’ (RTFS) and ‘bacterial cold water disease’ (BCWD), the two most significant systemic infections of primarily freshwater-reared salmonid fish. *F. psychrophilum* probably affects all species of salmonid fish (Borg, 1960), and among them coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and ayu (*Plecoglossus altivelis*) (Iida and Mizokami 1996) being particularly susceptible. In addition, *F. psychrophilum* has been isolated from diseased non salmonid fish species, such as European eel (*Anguilla anguilla*), common carp (*Cyprinus carpio*), and pale chub (*Zacco platypus*) (Lehmann *et al.* 1991; Iida and Mizokami 1996). Initially restricted to North America, infections are widely distributed throughout the world (Baltic, Atlantic and Mediterranean Europe; Chile, South America; Tasmania, Australia; Japan and Korea, Asia). Flavobacteriosis has been and continues to be one of the main causes of mortality in both fish hatcheries and nurseries, resulting in extensive economical losses for freshwater fish farms since the mid 80's. The actual factors determining virulence are not yet elucidated because of the too limited number of studies attempting to clarify the pathogenesis. To obtain insight into the disease mechanisms of *F. psychrophilum*, the complete genome sequences of two virulent strains (JIP02/86, (Duchaud *et al.* 2007); and CSF259-93, Wiens *et al.* unpublished data), have been determined and analyzed. Many putative secreted protease precursors as well as cell surface proteins (Dumetz *et al.* 2008)(Dumetz *et al.* 2008) have been identified and they may well be involved in the virulence and/or in the destruction of host tissues. Otherwise, the virulence of *F. psychrophilum* has been suspected previously to be related to its ability to produce exotoxins and/or endotoxins and to express extracellular proteases (Secades *et al.* 2001, 2003) or to regulate the iron uptake mediated by siderophores (Alvarez *et al.* 2008).

To limit fish infections by *F. psychrophilum*, treatment with antibiotics is required; since 1995 at which date chloramphenicol was prohibited, septicaemic flavobacteriosis have to be treated almost exclusively by oral administration with florfenicol because *F. psychrophilum* seems to be increasingly more resistant to some other approved drugs (Brunn *et al.* 2000) such as oxytetracycline, and no commercial vaccine is yet available. Rapid

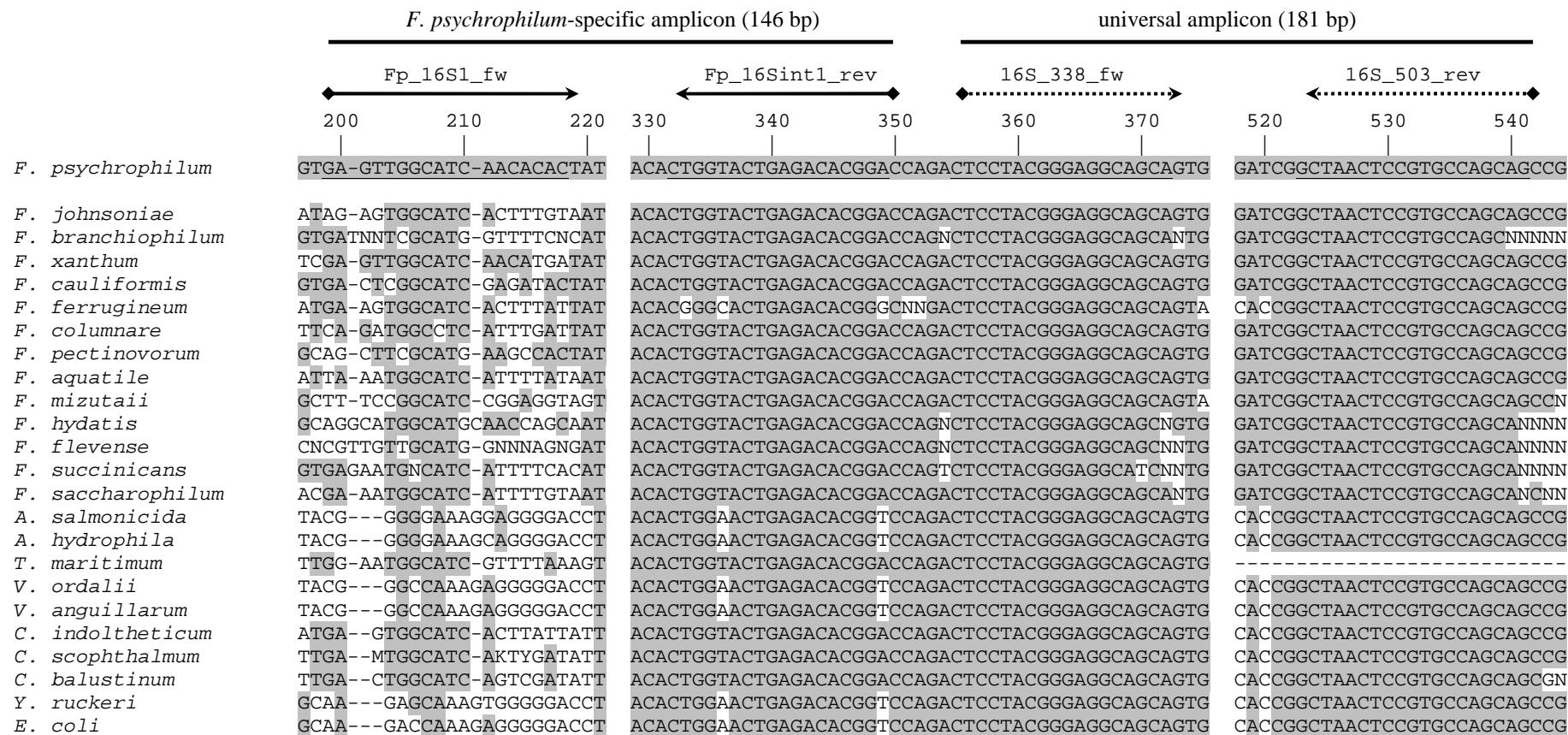
*3. Détection de *Flavobacterium psychrophilum**

### *3. Détection de Flavobacterium psychrophilum*

characterization of the infectious processes by *F. psychrophilum* is needed absolutely to limit the antibiotic treatments. Indeed, the use of drugs tends to be limited and strictly regulated by authorities for environmental and food safety considerations. Consequently, *F. psychrophilum* detection at the early stage of infection is very important for the prevention and treatment of BCWD or RTFS. Several tools to detect and identify *F. psychrophilum* have been set up; they included: traditional agar plate cultivation on tryptone yeast extract salts (TYES) agar; immunochemical analysis (immunofluorescence, antibody technique, (Madetoja and Wiklund 2002; Vatsos *et al.* 2006); colony blotting and immunostaining, (Misaka *et al.* 2008); quantitative enzyme-linked immunosorbent assay, (Lindstrom *et al.* 2009) or again, a method based on flow cytometry and immunomagnetic separation (Hibi *et al.* 2008). Polymerase chain reaction (PCR) has become an important method for the rapid, sensitive, and specific detection for bacterial and viral agents in the past decade; it has been used for *F. psychrophilum* detection (Urdaci *et al.* 1998; Cepeda and Santos 2000; Wiklund *et al.* 2000). Nested PCR strategies have been also developed targeting the 16S rRNA gene sequence, DNA gyrase subunit genes (*gyrA*, *gyrB*) and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C gene (*ppiC*) or the DNA topoisomerase IV subunit B gene (*parE*) (Baliarda *et al.* 2002; Izumi *et al.* 2003; Suzuki *et al.* 2008). Alternatively, an endpoint TaqMan-based polymerase chain reaction assay has been described for the detection of *F. psychrophilum*; it demanded subsequent verification to confirm the amplification specificity (Del Cerro *et al.* 2002b). The majority of these methods does not allow the detection of the pathogen at sufficient low infection levels or require specific and costly materials (e.g., flow cytometer). The qPCR method was applied to quantify the presence of microorganisms in complex environmental matrices (e.g., detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples, (Frahm and Obst 2003); quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant, (Harms *et al.* 2003). This method improves the accuracy and sensitivity of traditional PCR by using a fluorescently labeled probe so that the target gene can be detected and quantified directly.

Consequently, we developed a novel strategy for rapid, specific and sensitive detection of *F. psychrophilum* by qPCR using oligonucleotide primers targeting a highly variable segment of the 16S rRNA gene sequence.

### 3. Détection de *Flavobacterium psychrophilum*



**Fig.1.** Sequence comparison of 16S rRNA genes stretches among flavobacterial and non flavobacterial bacteria. *F. psychrophilum*-specific 16S rRNA gene primers (indicated by full line arrows) and universal 16S rRNA gene primers (indicated by dotted line arrows) were deduced from the sequence comparison of *F. psychrophilum* 16S rRNA gene sequence to 13 flavobacterial and 10 non-flavobacterial 16S rRNA gene sequences. Grey tinted characters are bases matching with those of *F. psychrophilum* 16S rRNA gene sequence. The nucleotide sequences of each primer are underlined below the *F. psychrophilum* sequence. The locations of both *F. psychrophilum*-specific and universal amplicons are indicated above the sequence alignment. Accession number for each sequence are: *F. psychrophilum* (FP0471); *F. johnsoniae* (CP000685); *F. branchiophilum* (D14017); *F. xanthum* (AJ601392); *F. cauliformis* (AY550033); *F. ferrugineum* (AM230484); *F. columnare* (HM480317); *F. pectinovorum* (AM921624); *F. aquatile* (M62797); *F. mizutaii* (X67853); *F. hydatis* (D12656); *F. flevense* (D12662); *F. succinicans* (D12673); *F. saccharophilum* (D12671); *Aeromonas salmonicida* (CP000644); *A. hydrophila* (DQ207728); *Tenacibaculum maritimum* (AM850059); *Vibrio ordalii* (EU107976); *V. anguillarum* (AM921803); *Chryseobacterium indoltheticum* (AY468448); *C. scophthalmum* (NR\_025386); *C. balustinum* (M58771); *Yersinia ruckeri* (AJ289197); and *E. coli* (CP000948).

## Material and methods

### Bacteria and growth conditions

The different *F. psychrophilum* strains and other bacteria used in this study and their origin are listed in Table 1. *F. psychrophilum* and other flavobacteria were cultivated in a modified Anacker and Ordal's (AOAE) liquid medium, 0.5% (w/v) tryptone, 0.05% (w/v) yeast extract, 0.02% (w/v) beef extract, 0.02% (w/v) sodium acetate (pH 7.2). Bacteria were incubated at 16°C under aerobic conditions (orbital stirring, 150 rpm). When the bacteria were harvested (optical density at 600 nm OD<sub>600</sub> = 0.8), purity was checked by examination of Gram-stained smears and the cells were pelleted for 10 min at 6,000 × g at 4°C and washed twice with phosphate buffered saline (PBS; 50 mM sodium phosphate buffer and 150 mM NaCl, pH 7.4). Alternatively, the following media were used: (i) the thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS; Difco) for *Vibrio*; (ii) YRM medium for *Yersinia*; (iii) SBB medium for *Aeromonas*; (iv) MRS medium (Difco) for Gram positive bacteria; (v) Luria Bertani medium for *Escherichia coli*.

### Primers design

Exhaustive alignment of *F. psychrophilum* strain JIP02/86 16S rRNA gene was performed with some non *F. psychrophilum* (i.e., *F. johnsoniae*; *F. branchiophilum*; *F. xanthum*; *F. cauliniformis*; *F. ferrugineum*; *F. columnare*; *F. pectinovorum*; *F. aquatile*; *F. mizutaii*; *F. hydatis*; *F. flevense*; *F. succinicans*; *F. saccharophilum*; *Aeromonas salmonicida*; *A. hydrophila*; *Tenacibaculum maritimum*; *Vibrio ordalii*; *V. anguillarum*; *Chryseobacterium indolicicum*; *C. scophthalmum*; *C. balustinum*; *Yersinia ruckeri*; and *E. coli*) 16S rRNA gene sequences using ClustalX (Larkin et al. 2007). One low scoring segment and one high scoring segment were identified from this analysis and used to design two sets of primer pairs that are expected (i) to be specific only to *F. psychrophilum* 16S rDNA sequences and (ii) to be specific to 16S rRNA genes from most of the bacteria that can be found as fish pathogens (including *F. psychrophilum*) (Fig. 1). Primer3 Software (Rozen and Skaletsky 2000) was used to design optimal primers combinations within non-specific *F. psychrophilum* 16S rRNA gene sequences that would work effectively as qPCR primers. The two primer sets were: the *F. psychrophilum* specific set named *F. psychrophilum*-specific primer set with Fp\_16S1\_fw

*3. Détection de *Flavobacterium psychrophilum**

### *3. Détection de Flavobacterium psychrophilum*

(5'-GAGTTGGCATCAACACAC-3') and Fp\_16Sint1\_rev (5'-TCCGTGTCTCAGTACCAG-3'), and the *F. psychrophilum* unspecific set, named universal primer set with 16S\_338\_fw (5'-CTCCTACGGGAGGCAGCA-3') and 16S\_503\_rev (5'-CTGCTGGCACGGAGTTAGC-3'). They encompass two segments (146 bp and 181 bp, respectively) of the 16S rRNA gene (GenBank accession number AF090991 for *F. psychrophilum*; (Bader and Shotts 1998)).

#### qPCR and cycling parameters

The qPCR assay was carried out in 25 µl reaction mixtures consisting of 1 µl of primer solution (2 µmol l<sup>-1</sup> each), 12.5 µl of Brilliant SYBR Green qPCR master mix 2X (Stratagene), 5 µl of template DNA solution and enough sterile MilliQ water to bring the total volume of the reaction to 25 µl. The qPCR parameters were as follows: initial denaturation of the DNA template at 96°C for 10 min, followed by 40 cycles of amplification of the DNA template in which each cycle consisted of denaturation at 96°C for 30 sec, primer annealing at 56°C for 30 sec and primer extension on the DNA template at 72°C for 30 sec. Following amplification, a melting curve analysis of the amplified DNA was performed from 65°C to 95°C with temperature increasing at a rate of 2°C per min. All qPCR assays were performed with a MX3000p Stratagene thermocycler (Agilent Technologies). During the primer extension steps, the fluorescence intensity from the amplified DNA was recorded by using the SYBR green I optic channel set at a wavelength of 495 nm. The initial threshold value was set at 1,000 fluorescence units. Following qPCR amplification, the amplified DNA was further analyzed by electrophoresis in a 2% agarose gel, and the expected size of the amplicons was confirmed by comparison with known DNA molecular weight markers (50 bp DNA step ladder, Promega).

#### Quantification standards for qPCR

To create qPCR standards specific to *F. psychrophilum*, a 16S rRNA gene fragment was amplified by the *F. psychrophilum*-specific primers. One copy of the resulting 146 bp amplicon was cloned into the pGEMt easy vector (Promega) and confirmed by sequencing. The purified recombinant plasmid DNA named pNO2 was quantified by UV

*3. Détection de *Flavobacterium psychrophilum**

### *3. Détection de Flavobacterium psychrophilum*

spectrophotometer (Victor, PerkinElmer) and then serially diluted in deionized water to a final concentration ranging from 1,000 to  $1 \times 10^{11}$  copies of *F. psychrophilum* 16S rRNA gene equivalent per ml. Five microliters aliquots of each dilution, making 5 to  $5 \times 10^8$  pNO2 copies/reaction, were used for qPCR in triplicate to create the standard curve and used as quantification standard for *F. psychrophilum* in biological samples. Similarly, a recombinant plasmid, pNO10, was created using the 16S rRNA gene fragment amplified with the universal 16S\_338\_fw and 16S\_503\_rev primers. For each bacterial strain tested, a specificity factor was calculated as the ratio of the number of *F. psychrophilum*-specific 16S rRNA gene copies to that of 16S rRNA gene copies obtained with the universal primers.

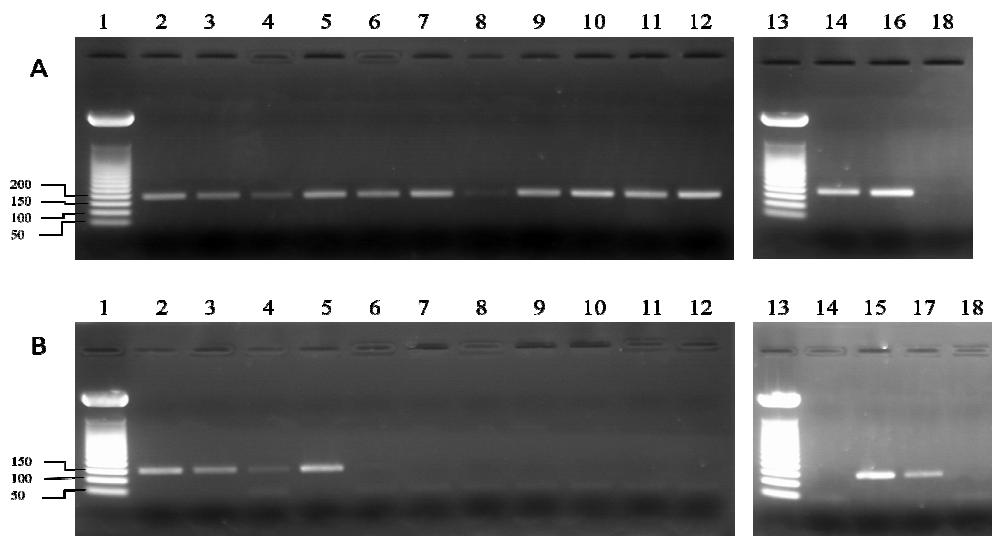
#### Quantification of *F. psychrophilum* carried by fish tissue samples

Tissue samples (skin, muscle, and gills) were collected from young unaffected or diseased trout ( $\approx 10$  g; three fish/diagnostic). Briefly, tissue samples (in triplicate each) were untreated or spiked with 10-fold dilutions of a *F. psychrophilum* JIP02/86 cell culture which titer had been enumerated. DNA extraction was performed with DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen Inc.) according to the manufacturer's instructions and prepared as qPCR templates as described above for quantification of *F. psychrophilum*. From a dissected tissue sample weighing 40 mg, 200  $\mu$ l of genomic DNA were eluted, from which 5  $\mu$ l were used in qPCR assay.

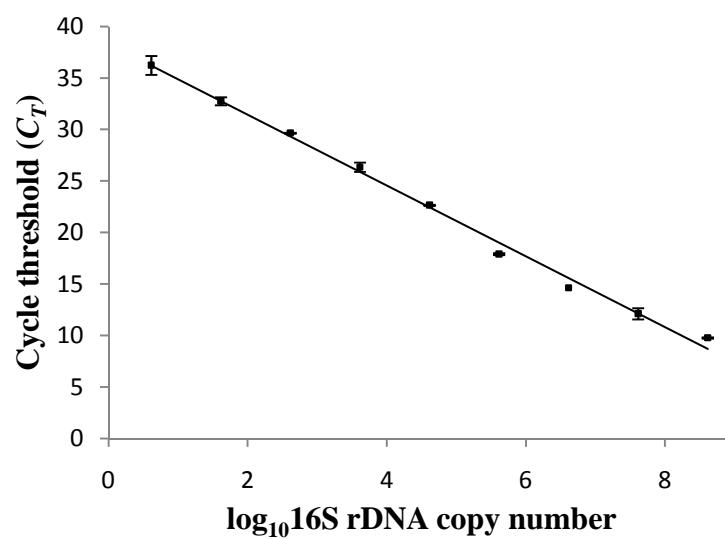
#### Statistical analysis

The Pearson product-moment correlation coefficient (r) was used to examine the relations between cycle threshold ( $C_T$ ) values and log concentrations of purified pNO2 plasmids. The non parametric Mann & Whitney U-test was used to analyze the numbers of *F. psychrophilum* cells quantified by qPCR into fish tissue samples.

### 3. Détection de *Flavobacterium psychrophilum*



**Fig.2.** Specific detection of *F. psychrophilum* strains assessed by agarose gel electrophoresis. PCR were performed using the universal primers (A) or the *F. psychrophilum*-specific primers (B). Lanes 1 and 13, DNA molecular weight markers (50 bp DNA step ladder; Promega); lanes 2-5, *F. psychrophilum* strains JIP02/86, G4, 08-194 and AU-0205, respectively; lanes 6-8: *Flavobacterium* species *branchiophilum*, *johsoniae* and *columnare*, respectively; lane 9: *Yersinia ruckeri*; lane 10: *Aeromonas salmonicida*; lane 11: *Vibrio anguillarum*; lane 12: *Shewanella putrefaciens*; lanes 14: *E. coli* devoid of plasmid; lane 15: *E. coli* transformed with pNO2; lane 16: purified pNO10 plasmid; lane 17: purified pNO2 plasmid; lane 18: milliQ water.



**Fig.3.** Calibration curves and sensitivity of qPCR for specific detection of *F. psychrophilum*. The plasmid pNO2 harbouring one copy of the 146 pb *F. psychrophilum*-specific 16S rRNA gene fragment was used as the standard. PCR were performed using *F. psychrophilum*-specific primers. Each data point represents the cycle threshold ( $C_T$ ) average of samples prepared in triplicate (error bars:  $\pm$  SD).

## Results

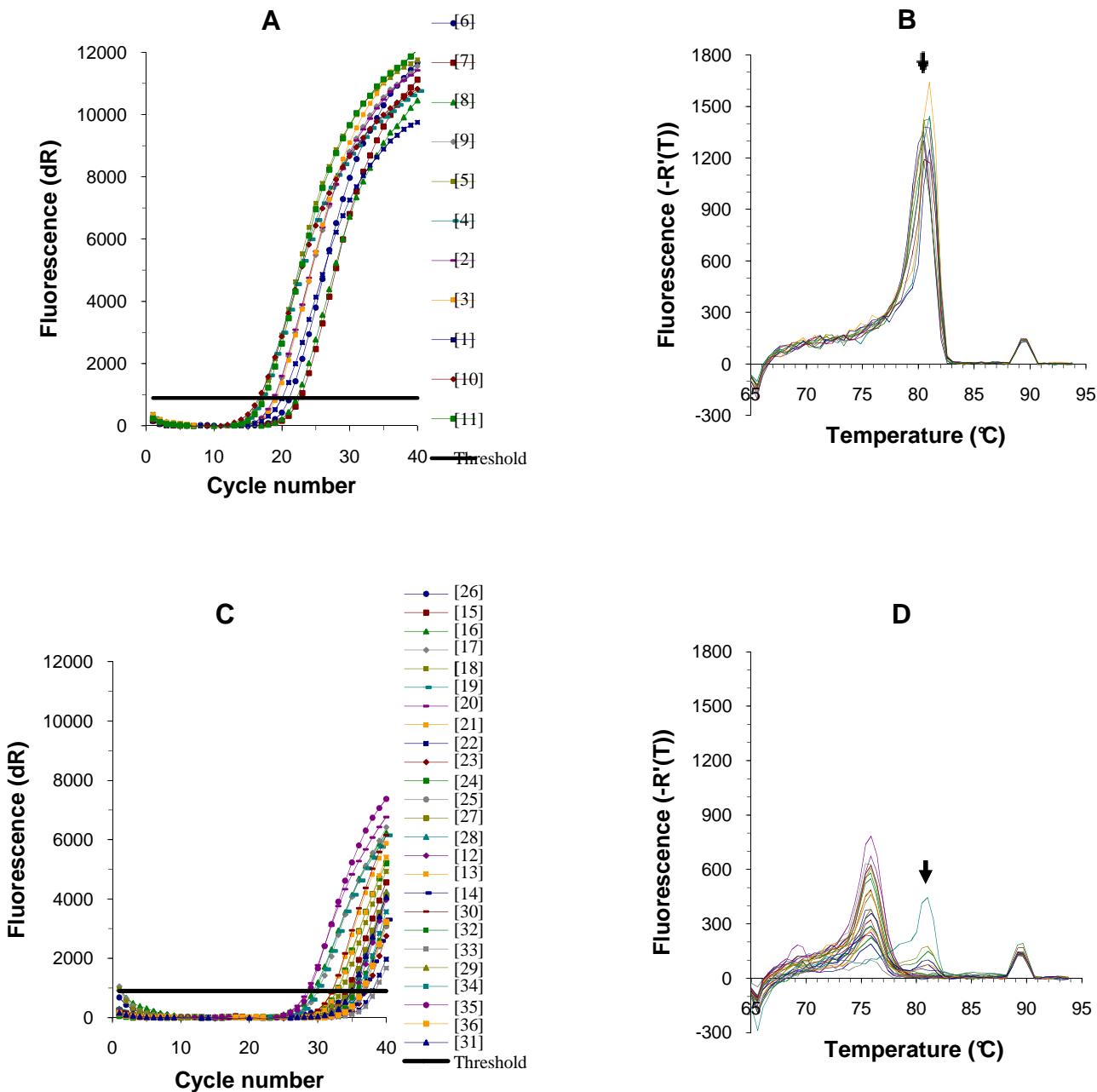
Validation of *F. psychrophilum*-specific and universal primer sets for qPCR assays, standard curve establishment and range of detection

The two primer sets were used as standard PCR with different *F. psychrophilum* strains, *Flavobacteria* species and some other fish pathogens in order to assess the ability of these sets to amplify one product from these samples. Using universal primers, one amplicon was successfully detected in all of the genomic DNAs here tested; it corresponds to the 16S rRNA genes with the expected size (181 bp) (Fig. 2A). In the presence of the *F. psychrophilum*-specific primer set, the 146 bp amplicon corresponding to the 16S rRNA gene was observed with *F. psychrophilum* samples only (Fig. 2B). Of course, both products were amplified from plasmids harboring (i) one copy of the *F. psychrophilum*-specific 16S rRNA gene fragment (pNO2; lanes 15 and 17, Fig. 2B) or (ii) one copy of the universal 16S rRNA gene fragment (pNO10; lane 16, Fig. 2A).

A standard curve for quantification of *F. psychrophilum* 16S rRNA gene was performed by qPCR assay with dilutions of known concentrations of pNO2 plasmids (Fig. 3). This allowed to draw a relationship ( $R^2 > 0.995$ ) between 16S DNA amplicons from  $4 \times 10^8$  down to 4 copies and corresponding  $C_T$  values equal to  $9.8 \pm 0.1$  up to  $36.3 \pm 0.9$ , respectively ( $C_T$  value for water samples being  $38.2 \pm 1.9$ ). A quantitative qPCR assay using dilutions of known concentrations of pNO10 plasmids was tested to validate the universal primer set to detect 16S rRNA gene sequences from all bacteria strains (data not shown). The standard curve presented a linear correlation ( $R^2 > 0.995$ ) between  $C_T$  values ranging from  $27.6 \pm 0.2$  to  $11.6 \pm 0.1$  and the corresponding copy numbers equal to 3120 and  $3.9 \times 10^8$ , respectively. The relative low sensibility of the universal amplicon detection can be explained by the well-known ability of universal rRNA-priming probes to bind all traces of 16S rDNA that might be present in water used for dilutions ( $C_T$  values for water samples equal to  $28.77 \pm 0.02$ ).

### Specificity test, amplification plots and dissociation curves

Bacterial suspensions were prepared from 11 *F. psychrophilum* isolates, 3 other flavobacteria strains (i.e., *F. columnare*, *F. johnsoniae*, *F. branchiophilum*) and some other Gram-negative or Gram positive bacteria to further assess the ability of the qPCR assay to detect and quantify *F. psychrophilum* cells only.



**Fig.4.** Detection of *F. psychrophilum* by qPCR using *F. psychrophilum*-specific primers. Templates were cell suspensions of *F. psychrophilum* strains (A) or of non-*F. psychrophilum* bacteria (C). (A and C) Representative graphs giving the fluorescence intensity vs cycle number for each sample, and from which the  $C_T$  values were deduced. Bacterial strains are numbered according to the identification numbers displayed in Table 1. (B and D) The corresponding melting curves expressed as the first derivative curves of the fluorescence intensity vs temperature. The arrows point out the  $T_m$  value corresponding to *F. psychrophilum* 16S rDNA amplicon.

### *3. Détection de Flavobacterium psychrophilum*

The cell lysates of target and non-target bacteria were used as qPCR templates in the presence of the specific primer set. Each *F. psychrophilum* strains tested here was detected at  $C_T$  values about  $18.9 \pm 2.2$  while non-target bacterial strains were detected at  $C_T$  values ranging from 28.5 to 38.4, the upper values being similar to that of the water blank ( $C_T$  36.8) used as negative control (Fig. 4A-C). Amplification of the specific *F. psychrophilum* 16S rDNA for all *F. psychrophilum* strains was confirmed by the melting temperature of the amplicon equal to  $80.5^{\circ}\text{C} \pm 0.6$  (Fig. 4B), and by gel electrophoresis (data not shown). Melting curves obtained with amplicons from all non-*F. psychrophilum* cells revealed different melting temperatures (about  $75.8^{\circ}\text{C}$ ) out of the *F. psychrophilum*-specific 16S rDNA  $T_m$  (Fig. 4 D). However, weak unexpected amplifications were observed with the *F. branchiophilum*, *F. columnare*, *Shewanella putrefaciens* and *Bacillus megaterium* strains. Indeed, the  $C_T$  values were recorded at  $35.47 \pm 0.39$  out of the  $C_T$  values range observed with *F. psychrophilum* cells, but the  $T_m$  corresponding to the amplicons were equal to  $81.03^{\circ}\text{C} \pm 0.04$  close to that observed for *F. psychrophilum*-specific 16S rDNA (see the arrow on Fig. 4D). This observation suggested a possible unexpected amplification with the *F. psychrophilum*-specific primer set from some non-*F. psychrophilum* bacteria. All bacteria samples tested were used as qPCR templates in the presence of the universal primer pair to ensure that the qPCR assay could function specifically, and also because the precise quantity of bacterial equivalent added per qPCR assay was unknown (Table 1). A specificity factor was determined for all bacterial strains as the ratio of the *F. psychrophilum*-specific 16S rDNA copies to that of the 16S rDNA copies obtained with the universal primers. The specificity factors ranged from 2 up to 28 for all *F. psychrophilum* strains tested here, indicating the relevance of the *F. psychrophilum*-specific primer set for *F. psychrophilum* quantification. The specificity factor values ranged from 0 up to  $8 \times 10^{-4}$  with all other eubacteria essayed here, including some non-*psychrophilum* flavobacteria. The non zero scores with the specificity factors observed for *B. megaterium* ( $8 \times 10^{-4}$ ), *F. columnare* ( $5 \times 10^{-4}$ ), *F. branchiophilum* ( $35 \times 10^{-6}$ ) and *S. putrefaciens* ( $2 \times 10^{-6}$ ) strains suggested an unspecific amplification with the *F. psychrophilum*-specific primer pair; they correspond to less than 122, 64, 4 or 0.4 *F. psychrophilum*-specific 16S rRNA gene copies, respectively, per 100,000 universal 16S rRNA gene copies, per reaction. Unlike the former hypothesis, the very low copy number observed with *F. psychrophilum*-specific primers suggested a probable very weak contamination of non-target cells tested here by traces of *F. psychrophilum* in the course of the sample preparations.

### 3. Détection de *Flavobacterium psychrophilum*

Table 1. List of bacteria

Id. Nber <sup>a</sup>	Species	Strain	Origin	Fp_specific 16S rDNA copies (mean ± SD)	universal 16S rDNA copies (mean ± SD)	Specificity factor (mean ± SD)
1	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	JIP02/86	Inra	$(2.5 \pm 0.6) \times 10^5$	$(8.3 \pm 0.8) \times 10^4$	$3.1 \pm 0.9$
2	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	NCIMB 1947 <sup>T</sup>	NCIMB	$(1.7 \pm 1.8) \times 10^6$	$(6.5 \pm 1.2) \times 10^4$	$27.7 \pm 33.9$
3	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	G4	Enitab	$(3.4 \pm 0.4) \times 10^5$	$(4.8 \pm 2.8) \times 10^4$	$11.1 \pm 7.7$
4	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	P0388	Enitab	$(2.6 \pm 1.0) \times 10^6$	$(1.9 \pm 1.0) \times 10^6$	$1.9 \pm 1.5$
5	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	F6	Enitab	$(2.8 \pm 1.7) \times 10^6$	$(5.2 \pm 0.7) \times 10^5$	$5.5 \pm 3.9$
6	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	08-2829	LD40	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^5$	$(5.0 \pm 2.1) \times 10^4$	$2.7 \pm 1.5$
7	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	08-194	LD40	$(33.4 \pm 0.8) \times 10^3$	$(1.6 \pm 0.3) \times 10^4$	$2.2 \pm 0.4$
8	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	08-255	LD40	$(5.8 \pm 1.5) \times 10^4$	$(1.8 \pm 0.8) \times 10^4$	$3.9 \pm 2.3$
9	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	08-214	LD40	$(3.8 \pm 0.9) \times 10^5$	$(4.4 \pm 1.0) \times 10^4$	$9.1 \pm 3.4$
10	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	AU 0205	Chile	$(1.9 \pm 0.3) \times 10^6$	$(1.3 \pm 0.6) \times 10^6$	$1.8 \pm 1.0$
11	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	AU 2706	Chile	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^6$	$(5.1 \pm 1.3) \times 10^5$	$2.5 \pm 0.8$
12	<i>Flavobacterium branchiophilum</i>	FL15	Inra	12.6	$(3.6 \pm 0.1) \times 10^5$	$(35.2 \pm 1.6) \times 10^{-6}$
13	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	UW101	ATCC	ND <sup>b</sup>	$(7.6 \pm 3.7) \times 10^5$	0
14	<i>Flavobacterium columnare</i>	08-336	LD40	3.9	$(8.1 \pm 1.7) \times 10^3$	$(5.1 \pm 1.3) \times 10^{-4}$
15	<i>Yersinia ruckeri</i>	07-1845	LD40	ND	$(1.8 \pm 0.5) \times 10^6$	0
16	<i>Yersinia ruckeri</i>	07-1884	LD40	ND	$(5.7 \pm 2.8) \times 10^6$	0
17	<i>Yersinia ruckeri</i>	07-1726	LD40	ND	$(24.6 \pm 1.0) \times 10^6$	0
18	<i>Yersinia ruckeri</i>	AU-0602	Chile	ND	$(3.4 \pm 0.1) \times 10^6$	0
19	<i>Aeromonas salmonicida</i>	08-1492	LD40	ND	$(1.9 \pm 1.0) \times 10^6$	0
20	<i>Aeromonas salmonicida</i>	08-1494	LD40	ND	$(8.4 \pm 1.4) \times 10^6$	0
21	<i>Aeromonas salmonicida</i>	AU-3103	Chile	ND	$(1.8 \pm 0.3) \times 10^6$	0
22	<i>Vibrio alginoliticus</i>	08-2498	LD40	ND	$(9.4 \pm 1.1) \times 10^5$	0
23	<i>Vibrio vulnificus</i>	08-2498	LD40	ND	$(4.3 \pm 0.3) \times 10^5$	0
24	<i>Vibrio anguillarum</i>	AU-2709	Chile	ND	$(4.0 \pm 0.8) \times 10^6$	0
25	<i>Vibrio ordalii</i>	AU-3006	Chile	ND	$(1.2 \pm 0.7) \times 10^6$	0
26	<i>Serratia liquefaciens</i>	01.6603	LD40	ND	$(5.0 \pm 1.2) \times 10^6$	0
27	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	7504	LD40	ND	$(7.0 \pm 2.3) \times 10^5$	0
28	<i>Shewanella putrefaciens</i>	08-2498	LD40	$5.4 \pm 1.4$	$(5.8 \pm 4.2) \times 10^6$	$(2.0 \pm 1.8) \times 10^{-6}$
29	<i>Salmonella enterica</i> sp <i>indiana</i>		Enitab	ND	$(4.9 \pm 3.4) \times 10^4$	0
30	<i>Escherichia coli</i>	JM109	Promega	ND	$(1.5 \pm 0.6) \times 10^5$	0
31	<i>Escherichia coli</i>	K12	Enitab	ND	$(1.4 \pm 0.6) \times 10^4$	0
32	<i>Enterococcus faecalis</i>		Enitab	ND	$(6.3 \pm 0.8) \times 10^3$	0
33	<i>Bacillus megaterium</i>		Enitab	1.5	$(2.3 \pm 1.1) \times 10^3$	$(8.0 \pm 4.2) \times 10^{-4}$
34	<i>Listeria innocua</i>		Enitab	ND	$(5.7 \pm 2.6) \times 10^4$	0
35	<i>Staphylococcus aureus</i>		Enitab	ND	$(1.4 \pm 0.7) \times 10^5$	0
36	<i>Pediococcus acidilactici</i>		Enitab	ND	$(3.4 \pm 1.1) \times 10^3$	0

\*: Specificity factor is the ratio *F. psychrophilum*-specific 16S rDNA copies vs universal 16S rDNA copies obtained for each bacterial strain tested.

<sup>a</sup>: Identification number. The corresponding bacteria numbering is the same than that used in fig. 4.

<sup>b</sup>: ND: no detection; below the detection threshold: the observed *C<sub>T</sub>* is greater than that of water.

### *3. Détection de Flavobacterium psychrophilum*

#### Primer accuracy with fish samples

To ensure that the *F. psychrophilum*-specific primer set could be used efficiently for *F. psychrophilum* detection/quantification directly on rainbow trout (i.e., in the presence of large amount of DNA from the host), three fish samples (skin, muscle and gills) were spiked or not with around  $38 \times 10^3$  *F. psychrophilum* cells per mg of tissue. Total DNAs were prepared and used as templates in qPCR assays (Table 2). From untreated fish samples, *F. psychrophilum* was not detected in gills while the cell quantity levels were found to be less than two flavobacteria per mg of tissue in skin and muscle. Such data indicate clearly that all healthy fish assayed here were unaffected carriers of *F. psychrophilum*. No significant difference has been observed between the quantified bacterial titers in the three spiked tissues and the amount of *F. psychrophilum* cells that had been experimentally deposited on fish organs. This indicates that the bacterial genomic DNA extraction yield is quantitative and it is not flawed by the organic matrix or the natural fish DNA. This new qPCR assay proved useful in determining the flavobacterial titers in tissues of diseased fish since values around  $10^3$  to  $10^4$  bacterial cells per mg of tissue were found; these densities found on organs taken from diseased fish were statistically different from those of unaffected fish.

#### Discussion

Rapid detection of *F. psychrophilum* as agent of BCWD as well as RTFS in aquaculture is an important step for the control of flavobacteriosis outbreaks. Moreover, it is essential to detect carrier fish without any sign of the diseases because of the aquaculture practices which include numerous exchanges of fish stocks from the egg production (the nursery) and juvenile fish (the hatchery) to the adult fish (i.e., the final farm). These exchanges favor flavobacteriosis spread originating from apparently unaffected fish.

Culture methods, widely used for routine controls, require different steps in the sample preparation making it impossible to determine the actual *F. psychrophilum* load in the sample. Moreover, the presence of viable but nonculturable *F. psychrophilum* forms, evaluated at 75% using standard conditions (Michel *et al.* 1999), lead to underestimation of the fish contamination. To overcome these difficulties, classic PCR (Toyama *et al.* 1996; Urdaci *et al.* 1998), multiplex-PCR (Del Cerro *et al.* 2002a; Onuk *et al.* 2010), nested-PCR (Baliarda *et al.* 2002; Madetoja and Wiklund 2002; Izumi *et al.* 2005), and quantitative loop-mediated isothermal amplification of DNA method (Fujiwara-Nagata and Eguchi 2009) have been

### 3. Détection de *Flavobacterium psychrophilum*

Table 2. Quantification of *F. psychrophilum* cells on fish tissue samples by qPCR

Samples	Cell number/mg quantified by qPCR (mean ± SD)						
Unaffected fish samples (controls)	<table> <tr> <td>Skin</td><td>1.8 ± 0.9*</td></tr> <tr> <td>Muscle</td><td>1.7 ± 0.2*</td></tr> <tr> <td>Gills</td><td>ND*</td></tr> </table>	Skin	1.8 ± 0.9*	Muscle	1.7 ± 0.2*	Gills	ND*
Skin	1.8 ± 0.9*						
Muscle	1.7 ± 0.2*						
Gills	ND*						
Unaffected fish samples (spiked) <sup>a</sup>	<table> <tr> <td>Skin</td><td>(1.2 ± 0.2) × 10<sup>4</sup> §</td></tr> <tr> <td>Muscle</td><td>(2.7 ± 0.5) × 10<sup>4</sup> §</td></tr> <tr> <td>Gills</td><td>(0.9 ± 0.6) × 10<sup>4</sup> §</td></tr> </table>	Skin	(1.2 ± 0.2) × 10 <sup>4</sup> §	Muscle	(2.7 ± 0.5) × 10 <sup>4</sup> §	Gills	(0.9 ± 0.6) × 10 <sup>4</sup> §
Skin	(1.2 ± 0.2) × 10 <sup>4</sup> §						
Muscle	(2.7 ± 0.5) × 10 <sup>4</sup> §						
Gills	(0.9 ± 0.6) × 10 <sup>4</sup> §						
Diseased fish samples	<table> <tr> <td>Skin</td><td>(5.4 ± 3.0) × 10<sup>3</sup>*</td></tr> <tr> <td>Muscle</td><td>(0.7 ± 0.3) × 10<sup>3</sup>*</td></tr> <tr> <td>Gills</td><td>(18.4 ± 24.9) × 10<sup>3</sup>*</td></tr> </table>	Skin	(5.4 ± 3.0) × 10 <sup>3</sup> *	Muscle	(0.7 ± 0.3) × 10 <sup>3</sup> *	Gills	(18.4 ± 24.9) × 10 <sup>3</sup> *
Skin	(5.4 ± 3.0) × 10 <sup>3</sup> *						
Muscle	(0.7 ± 0.3) × 10 <sup>3</sup> *						
Gills	(18.4 ± 24.9) × 10 <sup>3</sup> *						

ND: no detection

<sup>a</sup>: organs were spiked with a mean  $(3.8 \pm 0.5) \times 10^4$  bacteria per mg of tissue.

\*: statistical significance between *F. psychrophilum* quantified from diseased vs unaffected fish samples ( $p$  value < 0.05)

§: no statistical difference between deposited *F. psychrophilum* cells vs qPCR-quantified *F. psychrophilum* cells ( $p$  value > 0.05)

### *3. Détection de *Flavobacterium psychrophilum**

developed for identification/quantification of *F. psychrophilum* from biological samples. Some of them failed in the sensitivity levels since the latter were evaluated mainly as colony forming units (CFU) per mg of biological samples, i.e. about 25% of the true contamination. The advantages of qPCR over the classical PCR protocols are that (i) the assays do not demand time and manipulations with hazardous products such as ethidium bromide and (ii) the number of target gene copies present in the specimen can be determined without subsequent verification.

Here, we presented the first development of an original qPCR assay using two sets of primers for the detection of *F. psychrophilum* in fish tissues. The two primer sets and probe sequences used were designed from two regions within the *F. psychrophilum* 16S rRNA gene sequence that are: the first one, a highly interspecies variable segment of this gene and the second one, a highly conserved segment, respectively. The qPCR assay with the *F. psychrophilum*-specific primer set showed a log linear correlation of the genome copy number with PCR cycle threshold with a detection limit evaluated to four copies, i.e. less than one flavobacterial cell per reaction since *F. psychrophilum* genome contains 6 rRNA gene copies (Duchaud *et al.* 2007). However, an unexpected amplification was observed for few non-*F. psychrophilum* bacteria. Consequently, the qPCR assay using the universal primer set was used to calculate a specificity factor in order to reject any inaccurate amplification. Indeed, all specificity factors obtained from all *F. psychrophilum* strains tested were greater than 1 whereas they were below  $8 \times 10^{-4}$  for all non-*F. psychrophilum* strains.

The qPCR assay has been validated on fish tissues artificially infected or not with known amounts of *F. psychrophilum* cells. Indeed, no statistical difference was recorded between the flavobacteria density load on spiked samples and the one quantified by qPCR from fish samples after total extraction of DNA. This observation underlines the absence of any inhibitory factor during the qPCR analysis and any DNA loss during the extraction step. However, the non zero scores (about less than 2 cells/mg of tissue) obtained with all untreated fish organs are consistent with previous observations reporting that most (if not all) of rainbow trout in farms are unaffected carriers of *F. psychrophilum*, the flavobacteriosis being possibly triggered by environmental stresses (Dalsgaard and Madsen 2000). Moreover, this new technique allowed the differentiation between diseased and apparently healthy fish that could be unaffected carriers.

*3. Détection de *Flavobacterium psychrophilum**

### *3. Détection de Flavobacterium psychrophilum*

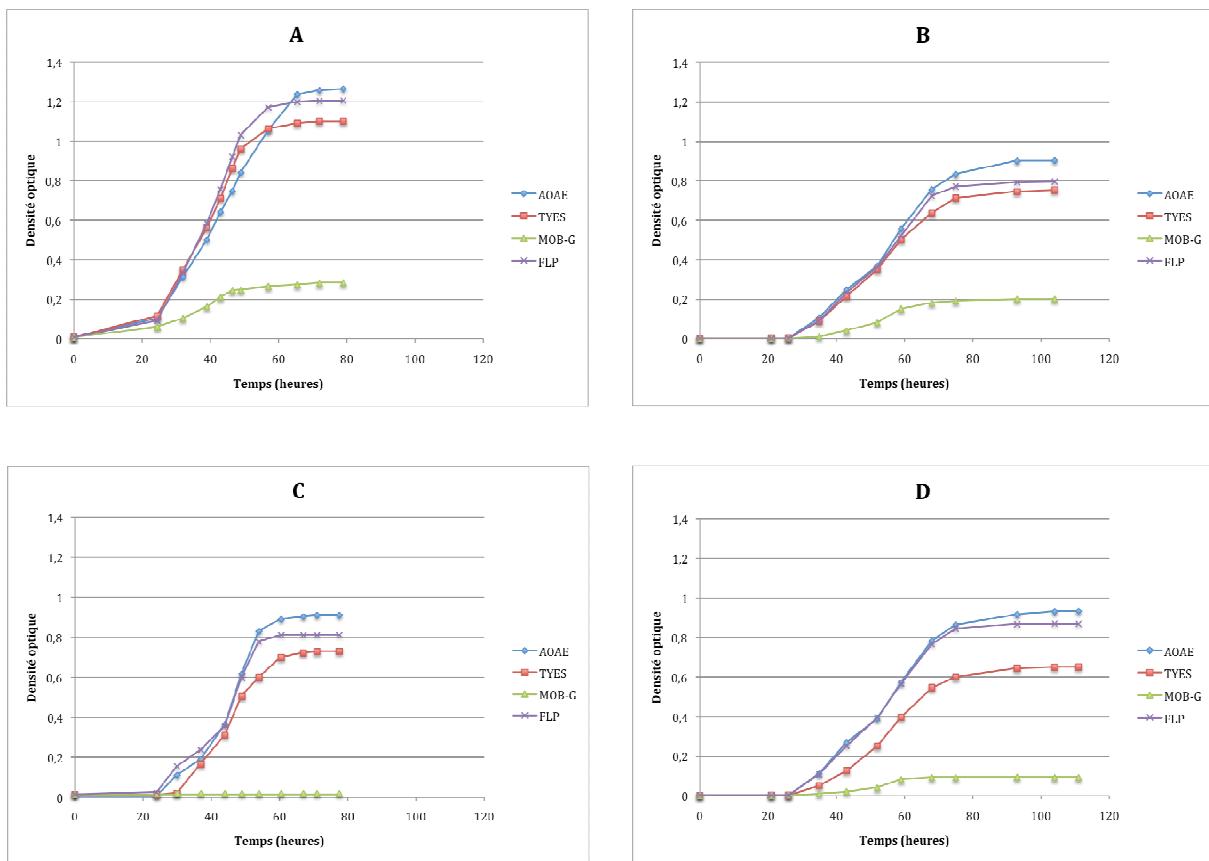
To summarize, the qPCR assay described here has provided accurate and sensitive counts of *F. psychrophilum* within three different organs from naturally unaffected or diseased fish as well as artificially contaminated fish tissues. This protocol might be well implemented to quickly test numerous samples collected from aquatic environments and fish tissues in order to monitor the *F. psychrophilum* infection at early stages.

### ACKNOWLEDGMENTS

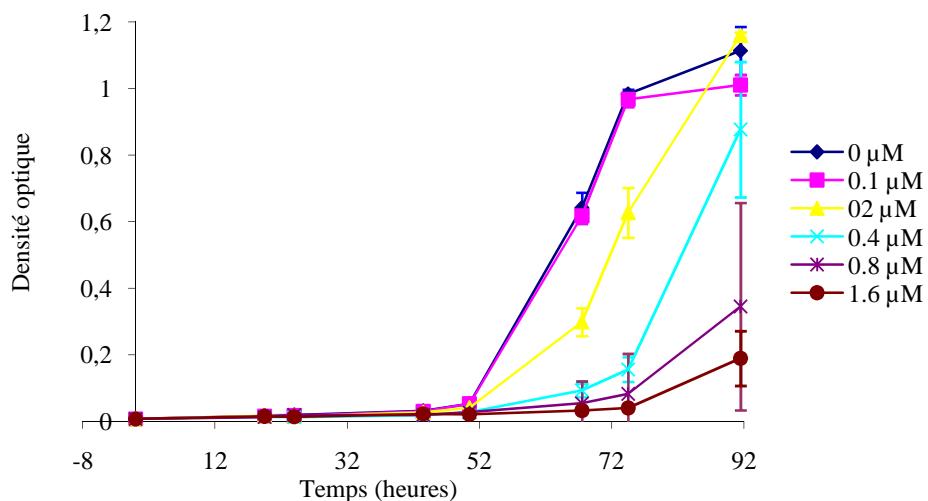
We would like to thank Drs. Ruben Avendaño-Herrera (Universidad Andres Bello, Viña del Mar Chile), Christian Michel and Jean-François Bernardet (INRA, Jouy-en-Josas, France) for the gift of some isolates of *F. psychrophilum* and Sandrine Papillon from Enitab for excellent technical assistance. This study was partly sponsored by grants from the ‘Région Aquitaine/FEDER’, the ‘Ecole Doctorale de l’Université de Bordeaux/Ministère de la Recherche’ and from the ‘Enita-Bordeaux’.



## **4. Approche écotoxicologique de la relation hôte-pathogène**



**Fig. 12.** Courbes de croissances mesurées par densité optique des flavobactéries en fonction des souches, de la température et du milieu de culture. [A] et [B] : souche LD40 08/214 ; [C] et [D] : souche JIP 02/86 ; [A] et [C] : 14 °C ; [B] et [D] : 18 °C



**Fig. 13.** Courbes de croissances mesurées par densité optique de la souche JIP 02/86 dans le milieu AOAE contaminé par des doses croissantes de cadmium sur une durée de 92 heures à 14 °C

## 4.1. Sensibilité de *F. psychrophilum* au cadmium

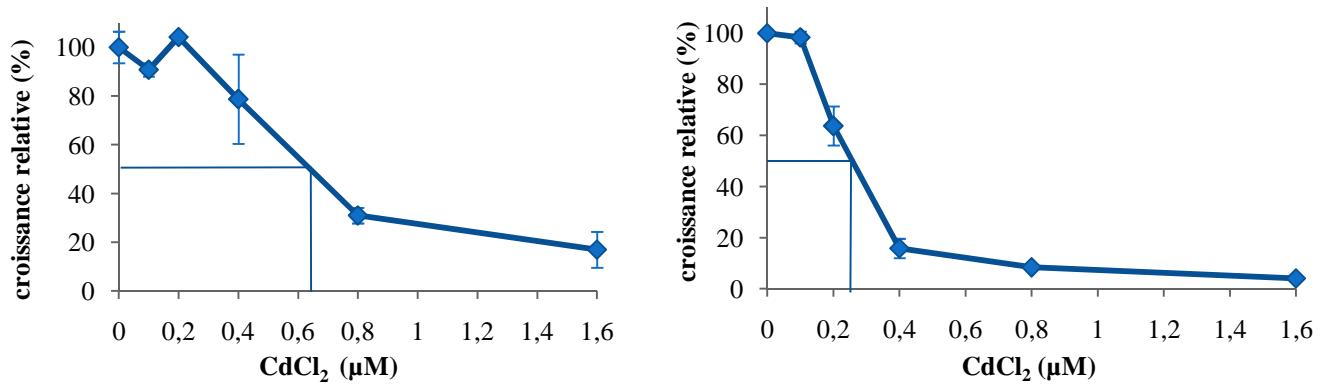
### 4.1.1. Tests préliminaires de croissance

Nous avons, de façon préliminaire, évalué les techniques de croissance optimale de la bactérie, de souches type ou dernièrement isolées de poissons malades, en laboratoire. Ainsi, les courbes de croissance de *F. psychrophilum* LD40 08/214 ont été mesurées à 14 et à 18 °C dans 4 milieux de culture distincts (AOAE, TYES, MOB-G, FLP) puis comparées avec celles obtenues avec la souche de référence JIP 02/86 (**Fig. 12**). Ces courbes montrent que le délai entre l'ensemencement et le démarrage de la croissance des flavobactéries ( $\approx$  20 heures) est du même ordre de grandeur quelles que soient la souche étudiée, la température ou le milieu. A l'évidence, le milieu MOB-G ne permet pas le développement correct des souches. La meilleure densité cellulaire ( $A_{600} = 1,2$ ) est obtenue avec la souche LD40 08/214 dans le milieu AOAE à 14 °C. La vitesse de doublement d'environ 4 heures, si elle reste modeste mais classique pour des flavobactéries, est meilleure pour la souche JIP 02/86 dans le milieu AOAE à 14 °C.

L'ensemble des résultats obtenus indique que pour atteindre un optimum de croissance, et donc une biomasse importante, il est préférable de cultiver *F. psychrophilum* LD40 08/214 sous agitation à 14 °C dans le milieu AOAE. Toutefois, il est nécessaire de bien suivre la croissance dans la mesure où des phénomènes de lyse bactérienne ont pu être observés en fin de phase stationnaire (4-5 jours post-ensemencement).

### 4.1.2. Impact du cadmium sur la croissance

En préalable d'une étude de l'impact du cadmium sur la relation hôte-pathogène *O. mykiss*-*F. psychrophilum*, il était nécessaire d'en connaître l'impact sur la croissance de la bactérie. Ainsi, des courbes de croissance de la souche JIP 02/86 dans un milieu AOAE contaminées avec des doses de cadmium croissantes durant 96 heures ont été réalisées à 14 °C (**Fig. 13**). La phase stationnaire de croissance est atteinte après 72 heures pour la culture témoin et celle contaminée par 0,1 µM de Cd. Elle est atteinte après 96 heures pour celle contaminée par 0,2 µM de Cd. Puis, pour les concentrations plus fortes (0,4, 0,8 et 1,6 µM de Cd) le début de la phase exponentielle et de celle stationnaire sont retardés. Le cadmium a donc un effet d'inhibiteur de croissance.



**Fig. 14.** Croissance relative de la souche JIP 02/86 en fonction de la concentration en cadmium dans le milieu AOAE à 14°C après 92 heures (A) et 72 heures (B). La IC<sub>50</sub> est de 0,62 µM de Cd après 92 heures et de 0,22 µM de Cd après 72 heures.

**Tableau 16.** Temps de division de *F. psychrophilum* JIP 02/86 après 72 heures de culture en fonction de la contamination en CdCl<sub>2</sub>

Temps de division	CdCl <sub>2</sub> (µM)					
	0	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6
Temps de division	4,8 h	4,8 h	6,0 h	9,9 h	12,0 h	24,0 h

#### *4. Approche écotoxicologique de la relation hôte-pathogène*

En effet, les croissances relatives (**Fig. 14**) montrent que la dose de cadmium nécessaire pour limiter la croissance de 50 % ( $IC_{50}$ ) est de 0,22 et 0,62  $\mu\text{M}$  de Cd après respectivement, 72 et 92 heures de culture, indiquant que le métal a un effet retardateur de croissance. A titre de comparaison la valeur de  $IC_{50}$  du cadmium pour *E. coli* après 12 heures de croissance est de 600  $\mu\text{M}$  (Achard-Joris *et al.* 2007). Les temps de division de la bactérie (**Tableau 16**), mesurés par construction des courbes  $\log(A600) / \log(2) = f(\text{temps})$  pendant la phase exponentielle de croissance, montrent que la croissance est diminuée d'un facteur 2 à 0,4  $\mu\text{M}$  de Cd par rapport au témoin (temps de division de 9,9 heures contre 4,8 heures) et d'un facteur 5 à 1,6  $\mu\text{M}$  de Cd (24,0 heures contre 4,8 heures).

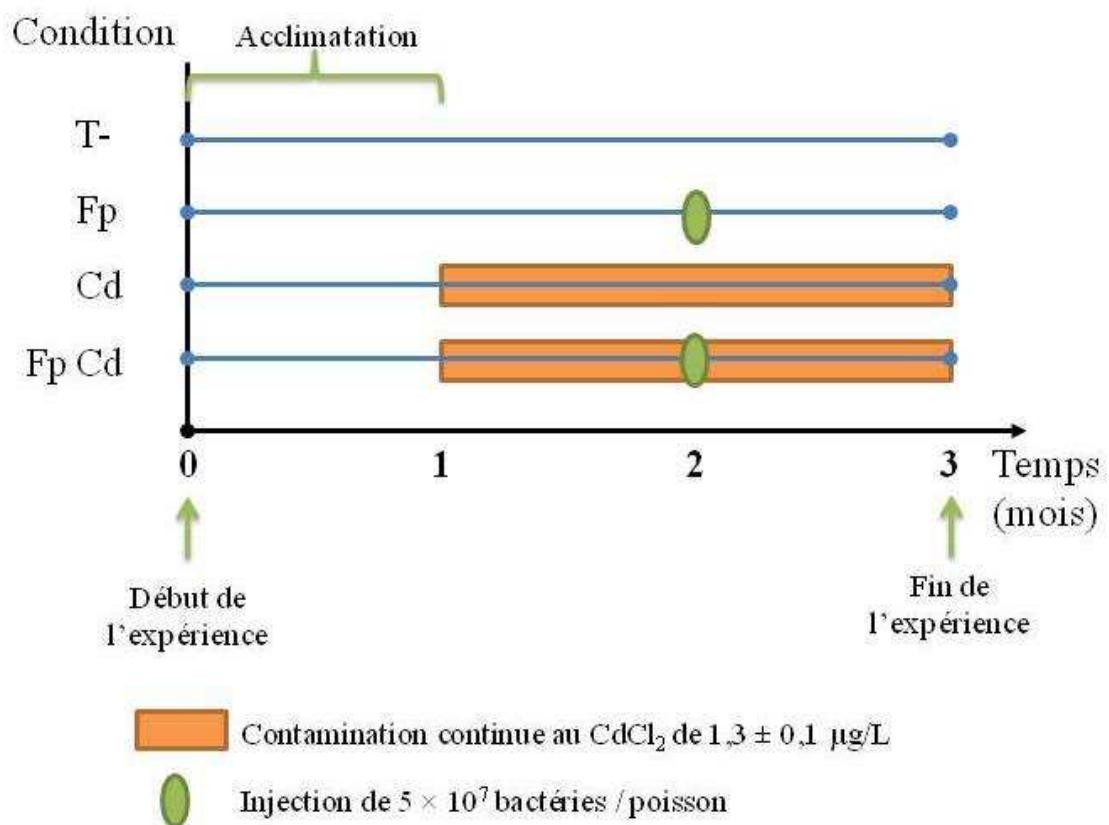
*F. psychrophilum* est donc une bactérie hyper-sensible au cadmium comparée aux autres bactéries Gram négatives. Après 92 heures de croissances en milieu sain et contaminé par 0,2  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ , la bioaccumulation de cadmium dans les bactéries a été mesurée. Elle est respectivement de  $1,2 \pm 0,7 \times 10^{-3}$  nmol/g de bactéries et  $3,2 \pm 0,4$  nmol/g de bactéries chez les contrôles.



## 4.2. Impact du cadmium sur la relation hôte-pathogène

### 4.2.1. Introduction

Afin d'entamer l'étude de l'impact de l'environnement sur la relation hôte-pathogène *O. mykiss-F. psychrophilum*, nous avons choisi de contaminer des truites arc-en-ciel en laboratoire avec la bactérie et un contaminant modèle : le cadmium. En effet, les facteurs environnementaux sont extrêmement nombreux, aussi nous avons choisi de nous focaliser sur un métal lourd auquel sont associées des propriétés immunodépressives. Cependant, tous les tests réalisés et publiés dans la littérature sur ce sujet ont utilisé de fortes doses de métal, et les effets peuvent être très différents selon les organismes et l'environnement étudié (Descotes 1992). Une diminution significative des globules blancs dans le sang du poisson rouge (*Carassius auratus*) a été observée après une contamination de l'eau au CdCl<sub>2</sub> à des doses écologiques abérantes comprises entre 90 et 445 µg/L, durant 3 à 6 semaines (Murad and Houston 1988). Cependant, aucun effet n'a été détecté chez la truite arc-en-ciel après 12 semaines d'exposition à des doses plus raisonnables de cadmium comprises entre 0,7 et 6 µg/L de CdCl<sub>2</sub> (Thuvander 1989). Afin de tester l'impact du cadmium sur l'infection de la truite arc-en-ciel par la flavobactéries, nous avons contaminé un lot de poissons avec 1 µg/L de Cd (8,8 nM de CdCl<sub>2</sub>) durant deux mois puis nous les avons infectés par injection de  $5 \times 10^7$  bactéries/poisson après le premier mois de contamination métallique (FpCd). En plus de cette condition, 3 contrôles ont été ajoutés. Un lot de poissons sans aucune contamination (T-), un lot contaminé exclusivement par le cadmium (Cd) et un lot pour lequel les poissons n'ont subi que la seule injection de bactéries (Fp). A l'issue de l'expérience, nous avons dosé le métal dans les branchies, le muscle, le foie, la rate et le rein ainsi que les anticorps par technique immuno-enzymatique dans le plasma. Une quantification de la bactéries a aussi été réalisée dans les mêmes organes afin de déterminer si une croissance et une propagation de l'agent pathogène avait eu lieu. Enfin, l'expression de deux gènes marqueur de l'immunité (*ill-β* et *tnf-α*) et un gène marqueur du stress oxydant et métallique (*mt-a*) a été mesurée pour mettre en lumière un éventuel effet croisé d'un pathogène et d'un métal trace sur le système immunitaire et la réponse au stress de l'hôte en comparant les niveaux d'expression de ces gènes dans les trois conditions FP, Cd et FpCd par rapport au témoin T-.



**Fig 15.** Schéma chronologique de l'expérimentation.

#### 4.2.2. Matériel et méthode spécifiques

##### Poissons

Un lot de 80 truites arc-en-ciel est prélevé dans une pisciculture d'Aquitaine au niveau d'une écloserie isolée, reconnue pour être dépourvue d'épisodes de flavobactérioses fréquents. Le poids des poissons croît de 5 g jusqu'à 20 g à la fin de l'étude. Les truites sont maintenues par groupes de 20 individus dans des bassins de 300 L alimentés en flux continu (environ 1 L à la minute) avec de l'eau du robinet déchlorée en colonne et filtrée sur charbon actif. Après un mois d'acclimatation, l'eau est contaminée ou non en continu durant 2 mois avec du CdCl<sub>2</sub> à une concentration finale de  $1,3 \pm 0,1 \mu\text{g Cd/L}$  grâce à une pompe péristaltique perfusant l'arrivée d'eau d'une solution mère de cadmium de concentration 100  $\mu\text{g Cd/L}$ . La concentration de contamination en métal est vérifiée et le débit de la pompe ajusté quotidiennement. Les poissons sont nourris à hauteur de 2 % de leur masse corporelle chaque jour par des granulés donnés par le pisciculteur. Après 1 mois de contamination métallique, les poissons sont infectés ou non par injection dans le muscle de la nageoire caudale de 50  $\mu\text{L}$  d'une culture fraîche de *F. psychrophilum* (LD40 08-214) en suspension dans du tampon PBS correspondant à une injection de  $5 \times 10^7$  bactéries par poisson. Les poissons contrôles ont reçu une injection du même volume de tampon PBS vierge de bactéries. Après un mois de double contamination, bactérienne et métallique, les poissons sont prélevés puis anesthésiés par balnéation dans une solution de benzocaïne à 50 mg/mL avant d'être disséqués (résumé chronologique Fig. 15).

##### Détection bactériennes

Le titre bactérien de la suspension de contamination ainsi que sa détection dans les organes des poissons (branchies, muscle, foie, rate et rein) est réalisé grâce à la technique qPCR ciblant le gène codant l'ARNr 16S décrite en matériel et méthode.

##### Dosage du cadmium dans l'eau et les tissus

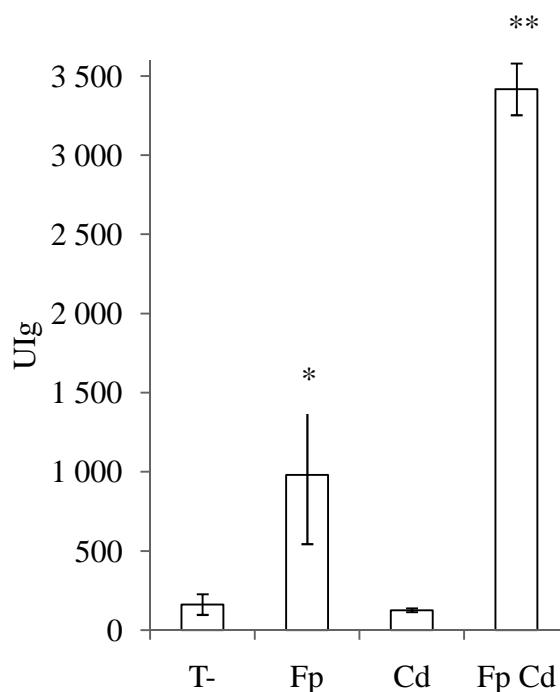
Le cadmium dans l'eau a été dosé quotidiennement par absorption après acidification dans une dilution appropriée. La même technique a été utilisée pour doser le cadmium dans les tissus de poissons après avoir été pesés puis minéralisés dans de l'acide nitrique pur.

**Tableau 17. Dosage du cadmium dans les organes des poissons en nmol Cd / g de tissus  $\pm$  SEM**

	Branchies	Muscle	Foie	Rate	Rein
Cd	2,5 $\pm$ 0,1	< LD	1,7 $\pm$ 0,1	0,35 $\pm$ 0,02	6,5 $\pm$ 0,4
FpCd	1,3 $\pm$ 0,1	< LD	2,1 $\pm$ 0,2	0,30 $\pm$ 0,01	4,3 $\pm$ 0,2

< LD: inférieur à la limite de détection.

La concentration en cadmium dans les organes des poissons issus des conditions T- et Fp sont toutes inférieures à la limite de détection.



**Fig 16.** Titre en anticorps anti *F. psychrophilum*  $\pm$  SEM dans le plasma des poissons issus des conditions témoins (T-), contaminés par la bactérie (Fp), par le cadmium (Cd) et par la bactérie et le cadmium (FpCd).

\* : moyenne statistiquement différente de celles des conditions (T-) et (Cd) (test U).

\*\* : moyenne statistiquement différente de celles des conditions (T-), (Fp) et (Cd) (test U).

**Tableau 18. Quantification de *F. psychrophilum* dans les organes des poissons (bactéries / g de tissus)**

	Branchies	Muscle	Foie	Rate	Rein
T-	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Fp	< LD	$1,2 \times 10^6$ (1/5) <sup>a</sup>	< LD	< LD	< LD
Cd	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
FpCd	< LD	$2,8 \times 10^5$ (1/5) <sup>a</sup>	< LD	< LD	< LD

<sup>a</sup> Résultat obtenu pour 1 poisson sur les 5 testés.

< LD: inférieur à la limite de détection.

#### Dosage des anticorps anti-*F. psychrophilum* dans le plasma des poissons

Un prélèvement de sang est réalisé par la veine caudale à l'issue des 2 mois de contamination immédiatement après l'anesthésie avec une seringue héparinée. L'échantillon de sang est ensuite mélangé à un volume d'héparine suffisant pour obtenir concentration finale aux alentours de 50 mg/mL puis conservé à 4 °C. Le plasma est ensuite récupéré par centrifugation à 1 000 × g durant 10 min à 4 °C. Les anticorps anti-*F. psychrophilum* sont dosés grâce à la technique ELISA décrite en matériel et méthode général.

#### Mesure de l'expression génique

Immédiatement après l'anesthésie, les poissons ont été disséqués et les organes destinés à la mesure de l'expression génique (muscle, branchies, foie, rein et rate) ont été conservés à -80 °C dans du RNA Later (Roche). Les techniques utilisées pour l'extraction des ARN, leur rétro-transcription puis leur quantification relative par RT-PCR sont décrites en matériel et méthode. Nous avons testé l'expression d'un gène de réponse au stress, celui de la métallothionéine A (*mt-a*) et de deux gènes de l'immunité, ceux de l'interleukine1-β (*ill1-β*) et du tumor necrosis factor α (*tnf-α*).

#### 4.2.3. Résultats

Durant les deux mois de l'étude, un suivi de mortalité a été effectué et aucune perte n'a été observée sur les lots de 20 poissons dans les 4 conditions T-, Fp, Cd et FpCd.

#### Dosage des métaux dans les tissus des poissons

Le cadmium a été dosé dans le muscle, les branchies, le foie, le rein et la rate des poissons contaminés par le cadmium (Cd), et de ceux à la fois contaminés par le cadmium et infectés par la bactérie (FpCd) (**Tableau 17**). La concentration en cadmium est inférieure à la limite de détection dans le muscle des poissons maintenus dans les deux conditions. Classiquement, lors de contaminations par des faibles doses de cadmium sur du long terme, les organes de transition comme les branchies et le foie sont faiblement contaminés, avec une concentration en cadmium autour de 2 nmol Cd /g de tissus. La rate est un organe qui bioaccumule peu le cadmium avec des concentrations trouvées de 0,35 ± 0,02 et 0,30 ± 0,01 nmol Cd/g de tissus pour les deux conditions Cd et FpCd respectivement.

**Tableau 19. Expression relative des gènes dans les organes des poissons de chaque condition**

Condition	Organes	Gènes		
		<i>mt-a</i>	<i>tnf-α</i>	<i>ilI-β</i>
T-	Muscle	$(3,5 \pm 2,0) \times 10^{-2}$	$(4,2 \pm 3,5) \times 10^{-5}$	$(1,3 \pm 1,3) \times 10^{-5}$
	Branchies	$(2,1 \pm 1,3) \times 10^{-2}$	$(9,2 \pm 4,3) \times 10^{-5}$	$(1,2 \pm 1,1) \times 10^{-4}$
	Rate	$(2,0 \pm 1,1) \times 10^{-2}$	$(2,3 \pm 0,5) \times 10^{-5}$	$(5,4 \pm 0,4) \times 10^{-6}$
	Foie	$3 \pm 3$	$(1,3 \pm 0,6) \times 10^{-5}$	$(6,7 \pm 1,8) \times 10^{-7}$
	Rein	$(1,2 \pm 0,5) \times 10^{-1}$	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^{-5}$	$(3,4 \pm 1,7) \times 10^{-6}$
Fp	Muscle	$(6,9 \pm 2,8) \times 10^{-2}$	$(18 \pm 13) \times 10^{-5}$	$(56 \pm 42) \times 10^{-5}$
	Branchies	$(3,4 \pm 0,7) \times 10^{-2}$	$(14 \pm 2) \times 10^{-5}$	$(2,7 \pm 0,6) \times 10^{-4}$
	Rate	$(1,9 \pm 0,6) \times 10^{-2}$	$(1,9 \pm 0,6) \times 10^{-5}$	$(83 \pm 13) \times 10^{-6}$
	Foie	$2,9 \pm 0,8$	$(9,9 \pm 9,5) \times 10^{-5}$	$(940 \pm 430) \times 10^{-7}$
	Rein	$(12 \pm 5) \times 10^{-1}$	$(11 \pm 3) \times 10^{-5}$	$(450 \pm 120) \times 10^{-6}$
Cd	Muscle	$(6,9 \pm 2,5) \times 10^{-2}$	$(20 \pm 22) \times 10^{-5}$	$(3,0 \pm 0,6) \times 10^{-5}$
	Branchies	$(1,7 \pm 1,0) \times 10^{-2}$	$(8,2 \pm 3,6) \times 10^{-5}$	$(1,8 \pm 0,9) \times 10^{-4}$
	Rate	$(1,2 \pm 0,5) \times 10^{-2}$	$(3,1 \pm 2,2) \times 10^{-5}$	$(110 \pm 80) \times 10^{-6}$
	Foie	$2,2 \pm 0,4$	$(0,76 \pm 0,04) \times 10^{-5}$	$(190 \pm 140) \times 10^{-7}$
	Rein	$(3,4 \pm 1,3) \times 10^{-1}$	$(5,0 \pm 3,2) \times 10^{-5}$	$(90 \pm 29) \times 10^{-6}$
FpCd	Muscle	$(6,0 \pm 2,8) \times 10^{-2}$	$(23 \pm 21) \times 10^{-5}$	$(79 \pm 91) \times 10^{-5}$
	Branchies	$(4,5 \pm 0,2) \times 10^{-2}$	$(30 \pm 7) \times 10^{-5}$	$(3,7 \pm 1,4) \times 10^{-4}$
	Rate	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^{-2}$	$(32 \pm 19) \times 10^{-5}$	$(170 \pm 150) \times 10^{-6}$
	Foie	$3,2 \pm 0,6$	$(11 \pm 1) \times 10^{-5}$	$(300 \pm 90) \times 10^{-7}$
	Rein	$(8,2 \pm 1,0) \times 10^{-1}$	$(4,0 \pm 0,9) \times 10^{-5}$	$(100 \pm 10) \times 10^{-6}$

**Tableau 20. Expression différentielle des gènes dans les organes des poissons contaminés par rapport aux poissons témoins**

	Fp / T	Cd / T	FpCd / T
<b>Muscle</b>			
<i>mt-a</i>	=	=	=
<i>ilI-β</i>	43	=	=
<i>tnf-α</i>	=	=	=
<b>Branchies</b>			
<i>mt-a</i>	=	=	2,1
<i>ilI-β</i>	=	=	=
<i>tnf-α</i>	=	=	3,3
<b>Rate</b>			
<i>mt-a</i>	=	=	=
<i>ilI-β</i>	15	21	32
<i>tnf-α</i>	=	=	14
<b>Foie</b>			
<i>mt-a</i>	=	2	=
<i>ilI-β</i>	134	27	43
<i>tnf-α</i>	=	=	8,7
<b>Rein</b>			
<i>mt-a</i>	10,5	2,9	6,9
<i>ilI-β</i>	133	27	29
<i>tnf-α</i>	9,6	4,4	3,6

#### 4. Approche écotoxicologique de la relation hôte-pathogène

L'organe le plus contaminé après deux mois d'exposition est le rein qui présente des concentrations de  $6,5 \pm 0,4$  et  $4,3 \pm 0,2$  nmol Cd /g de tissus respectivement pour les deux mêmes conditions.

##### Détection et quantification de la bactérie dans les tissus des poissons

La bactérie a été quantifiée dans les branchies, le muscle (au niveau de la zone d'injection), le foie, la rate et le rein un mois après l'infection par injection (**Tableau 18**). Elle a été détectée seulement dans le muscle des poissons préalablement infectés sur 1 poisson sur 5 testés dans les conditions Fp et FpCd à hauteur de  $1,2 \times 10^6$  et  $2,8 \times 10^5$  bactéries / g de tissu respectivement.

##### Dosages des anticorps anti-*F. psychrophilum*

Les anticorps anti-*F. psychrophilum* ont été dosés par ELISA dans le plasma des truites (**Fig. 16**). Les poissons des conditions T- et Cd présentent des titres en anticorps résiduels respectivement de  $162 \pm 65$  et  $126 \pm 12$  UIg. En revanche, les poissons infectés des conditions Fp et FpCd présentent des titres significativement supérieurs à celui du T-, de  $980 \pm 437$  et  $3416 \pm 163$  UIg, respectivement. Le titre des poissons de la condition FpCd est lui-même significativement 3,5 fois supérieur à ceux de la condition Fp.

##### Mesure de l'expression génique

L'expression du gène impliqué dans la réponse au stress (*mt-a*) ainsi que des 2 gènes de l'immunité (*ill-β* et *tnf-α*) a été quantifiée dans le muscle, les branchies, le foie, la rate et le rein des poissons maintenus dans les 4 conditions T-, Fp, Cd et FpCd. Les moyennes  $\pm$  SD des niveaux d'expression de ces gènes (relativement à l'expression de l'actine) sont rassemblées dans le **Tableau 19**. A partir des données de ce tableau, les expressions différencielles significatives entre les 3 conditions Fp, Cd et FpCd, et la condition T- ont été calculées (**Tableau 20**). Dans le muscle, au niveau de la zone d'injection, le gène *ill-β* est surexprimé 43 fois dans la condition Fp par rapport aux poissons témoins. Dans le foie et le rein, la forte surexpression de ce gène après infection ( $\times 134$  dans le foie et  $\times 133$  dans le rein) est amoindrie par le cadmium (abaissement à un facteur de surexpression de 43 dans le foie et de 29 dans le rein). De même, la surexpression du gène *tnf-α* dans le rein des truites infectées (par  $\times 9,6$ ) est abaissée par la contamination au cadmium (à  $\times 3,6$ ). En revanche, la



#### 4. Approche écotoxicologique de la relation hôte-pathogène

combinaison de l'infection et de la contamination rend compte d'une surexpression du gène *tnf-α* dans le foie (par × 8,7).

Dans la rate, organe peu contaminé par le cadmium, la flavobactérie et le métal provoquent une surexpression du gène *il1-β* respectivement d'un facteur 15 et 21, avec un effet de synergie chez les poissons infectés et contaminés où ce même gène est surexprimé par un facteur 32. Dans le rein, organe très fortement contaminé par le cadmium, le gène *mt-a* est surexprimé dans les trois conditions Fp, Cd et FpCd.

##### 4.2.4. Discussion

Après deux mois de contamination à 1 µg CdCl<sub>2</sub>/L et une injection de  $5 \times 10^7$  *F. psychrophilum* par individu à un mois de l'arrêt de l'étude aucun des poissons n'est tombé malade et aucune mortalité causée par le pathogène n'a été déplorée. La difficulté à reproduire la flavobactériose est bien connue. En effet, une infection par injection peut produire de 0 à 100 % de mortalité lors d'une expérimentation selon la souche utilisée et les résultats sont faiblement reproductibles (Holt 1987; Decostere *et al.* 2000). Au cours de cette étude, nous constatons que le titre bactérien a chuté au niveau de la zone d'injection après un mois. Cela démontre que la bactérie n'a pas réussi à entrer en phase d'infection et de colonisation dans d'autres compartiments de l'organisme. Il peut être supposé que (i) la bactérie n'était pas dans de bonnes conditions pour se multiplier dans les initiaux suivant l'infection, (ii) le système immunitaire du poisson a réussi à l'éliminer partiellement. La production significative d'anticorps anti-*F. psychrophilum* montre en tout cas qu'une réponse immunitaire a bien eu lieu.

L'expression génique démontre que le cadmium peut avoir des effets contradictoires sur le système immunitaire du poisson. En effet, dans la rate, organe où la bioaccumulation en cadmium est faible (environ 0,3 nmol Cd/g de tissu), on observe une synergie du métal et de l'infection pour l'induction du gène pro-inflammatoire *il1-β*. De plus, la rate étant l'organe principal de maturation des cellules productrices d'anticorps, cette synergie se retrouve aussi au niveau du titre en immunoglobulines anti-*F. psychrophilum* dans le sang des poissons. On note également un effet synergique du double traitement pour le gène *tnf-α* dans le foie, la rate et les branchies et, pour le gène *mt-a*, dans les branchies.



#### *4. Approche écotoxicologique de la relation hôte-pathogène*

Dans le rein, les gènes *il1-β* et *tnf-α* sont surexprimés en réponse à chaque traitement appliqué séparément, mais la combinaison de ces deux traitements ne conduit pas à un effet additif (le niveau de surexpression est même 3 à 4 fois inférieur à celui observé dans le cas de l'infection seule). La même remarque peut être faite dans le cas de l'expression d'*il1-β* dans le foie et de *tnf-α* dans le rein.

Remarquablement, en réponse à l'infection par la flavobactérie, des niveaux de surexpression très importants sont observés pour *il1-β* dans la rate, le foie et le rein, et pour *mt-a* et *tnf-α* dans le rein, alors que le titre en flavobactérie dans ces tissus est indétectable. Cela peut être expliqué par la migration dans ces organes de lignées cellulaires sanguines stimulées par l'infection.

La difficulté à reproduire la colonisation après l'infection bactérienne en laboratoire est une limite majeure de cette étude, puisqu'elle nous empêche de savoir si une telle contamination aurait perturbé la relation hôte-pathogène dans le milieu aquacole dans le sens d'une aggravation du caractère pathogène de la flavobactérie. Il a donc été décidé de s'orienter vers les fermes aquacoles où la flavobactérie arrive à coloniser les poissons après infection.



### 4.3. Travail sur un site contaminé et un poisson modèle

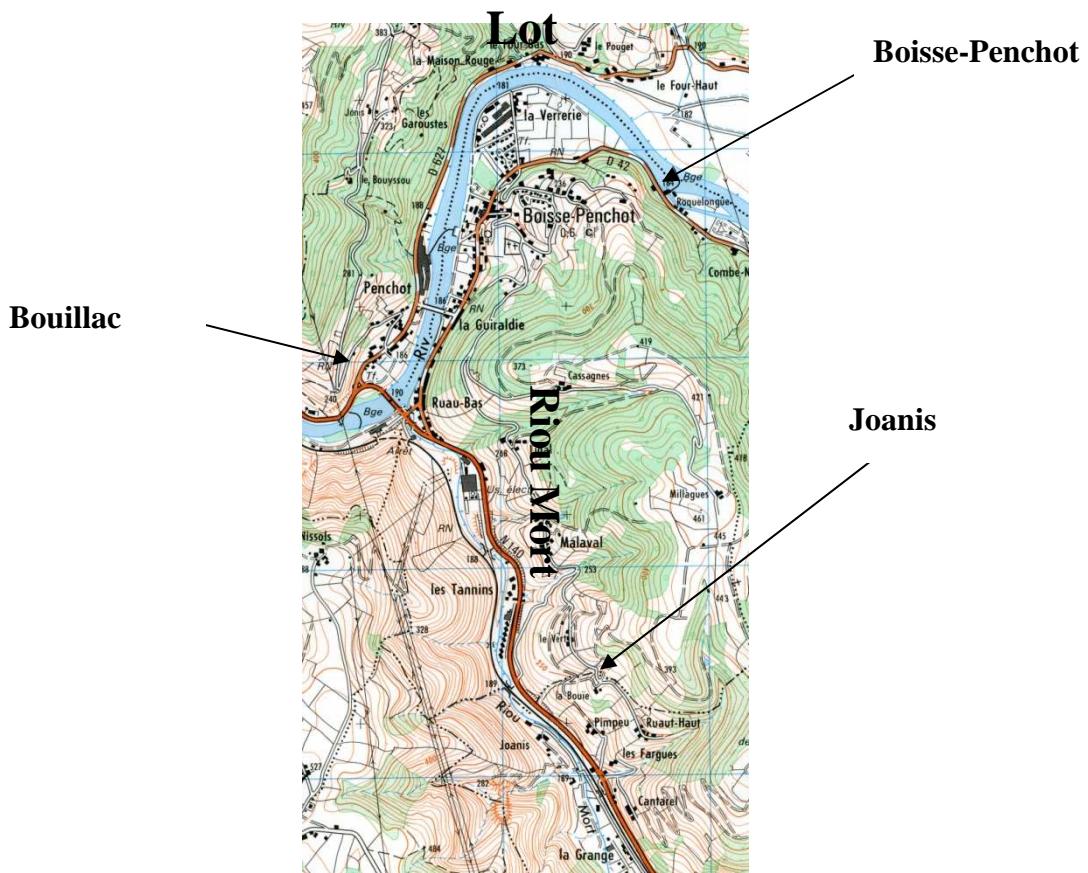
#### 4.3.1. Introduction

En 2006, une étude sur l'impact d'une eau de rivière contaminée par le cadmium et le zinc sur le poisson zèbre *Danio rerio* a été réalisée. Il a été mesuré : 1/ la bioaccumulation des métaux, 2/ leur génotoxicité et 3/ leur impact sur l'expression de gènes de réponse au stress, du métabolisme mitochondrial, de l'apoptose et de réparation de l'ADN. Nous nous sommes inspirés de ce travail pour l'étude de l'impact de l'environnement sur la relation hôte-pathogène *O. mykiss-F. psychrophilum* en aquacultures.

Le poisson zèbre *Danio rerio* est un bon modèle biologique pour l'étude des réponses génétiques et bioénergétiques vis-à-vis des contaminations métalliques, notamment par le mercure et le cadmium. De plus, ce poisson supporte bien la vie en aquarium, il est de petite taille et son génome est entièrement séquencé et public. Une étude préalable en microcosme a montré par dosage qu'après une contamination par voie directe de 9,6 µg Cd/L pendant 21 jours, le Cd est bioaccumulé dans les branchies, le foie, le cerveau et le muscle squelettique par ordre décroissant (Gonzalez *et al.* 2006). Il a aussi été montré que cette contamination provoque l'induction significative de certains gènes de réponse au stress oxydant, de chélation des métaux, de résistance aux xénobiotiques, du métabolisme mitochondrial, d'apoptose et de réparation de l'ADN.

Au sein de l'équipe GEMA d'Arcachon, il a récemment été mis au point une méthode de détection des atteintes génotoxiques par RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) avec l'utilisation d'une amorce discriminante OPB11 : 5'-GTAGACCCGT-3' et d'une amorce de référence OPB7 non discriminante : 5'-GGTGACGCAG-3'. Cette méthode couplée à la PCR quantitative est utilisée sur *Danio rerio* et permet la mise en évidence du pouvoir génotoxique du Cd (Cambier *et al.* 2010). Comme cette méthode est récente, il était opportun de la comparer avec d'autres méthodes éprouvées comme le test des comètes (Singh *et al.* 1988; Devaux *et al.* 1997) et le dosage de la 8-ceto-désoxyguanosine (ESCOOD 2002b, a).

Dans une optique plus environnementale, et afin de confronter ces techniques à des poissons exposés à l'eau de milieux naturels, nous avons exposé des poissons zèbre à des eaux de rivières contaminées par différents métaux dont le Cd et le Zn. Ainsi, une



**Fig. 17.** Cartographie des sites retenus pour l'étude.

#### *4. Approche écotoxicologique de la relation hôte-pathogène*

contamination sur 14 jours par l'eau du Lot et du Riou Mort (Aveyron) percolant les terrils de l'ancienne mine d'extraction de zinc "Vieille-Montagne" a été réalisée. Trois sites ont été choisis : Boisse-Penchot comme référence, Bouillac comme site faiblement contaminé et Joanis sur le Riou Mort en aval du site Vieille-Montagne comme site très contaminé (**Fig. 17**). L'eau des bacs des poissons a été renouvelée chaque jour par tiers avec de l'eau de rivière puisée quotidiennement puis chauffée à  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$  (afin d'éviter un choc thermique aux poissons). Au cours de l'étude, trois temps de prélèvement ont été effectués après 3, 7 et 14 jours.

##### **4.3.2. Résultats et discussion**

Le niveau de contamination des sites a été mesuré et confirme la présence d'un gradient polymétallique sur le site d'étude. En effet, les concentrations en Cd dans les bacs correspondant à Joanis et Bouillac étaient comprises respectivement dans les intervalles 4,3 - 15,3 et 0,45 - 0,67  $\mu\text{g Cd/L}$ , et inférieures à la limite de détection (0,05  $\mu\text{g Cd/L}$ ) dans celui correspondant à Boisse-Penchot. Les concentrations en Zn dans les bacs correspondant à Joanis, Bouillac et Boisse-Penchot étaient comprises pour leur part respectivement dans les intervalles 440 - 651, 23 - 78 et 2,2 - 14  $\mu\text{g Zn/L}$ . La bioaccumulation du Zn dans les branchies et l'appareil digestif des poissons, n'était significative que dans le bassin correspondant à Joanis après 3 et 7 jours de contamination. Ce résultat indique une forte implication de mécanismes homéostatiques régulant la présence de Zn dans l'organisme. Quant au Cd, il était significativement bioaccumulé dans le cerveau, les branchies et l'appareil digestif des poissons évoluant dans les bacs correspondant à Joanis et Bouillac. Cependant, les niveaux de bioaccumulation étaient inférieurs à ceux mesurés sur des poissons contaminés en laboratoire à des concentrations équivalentes, démontrant que les expositions contrôlées en laboratoires ne sauraient rendre compte de la complexité du milieu environnemental.

En termes de génotoxicité, le test comète a révélé des dommages à l'ADN, par la mesure du pourcentage d'ADN présent dans la tête par rapport à celui présent dans la queue de la comète, chez les poissons maintenus dans le bassin correspondant à Joanis après 3 jours de contamination. Ces dommages n'étaient plus détectés après 7 et 14 jours, suggérant qu'une réparation s'était produite. La RAPD-PCR décèle et quantifie pour sa part, des dommages à l'ADN sur les poissons élevés pendant 3 jours dans les eaux de Joanis et pendant 14 jours pour ceux élevés dans les eaux de Bouillac. En revanche, le dosage de la 8-ceto-



#### *4. Approche écotoxicologique de la relation hôte-pathogène*

desoxyguanosine n'a pas permis de détecter de dommages chez les poissons nageant dans l'eau des trois sites étudiés. Le rassemblement des résultats de la RAPD et du test des comètes, techniques à l'évidence complémentaires, permet de mettre en lumière des dommages précoce à l'ADN après 3 jours de contamination pour le site le plus contaminé et après 14 jours pour le site modérément contaminé.

L'analyse de l'expression génique révèle quant à elle : 1/ une surexpression dans les branchies et le cerveau du gène *sod* après 3 jours d'exposition dans les eaux de Joanis, dans l'appareil digestif après 7 jours dans les eaux de Joanis et après 14 jours dans les eaux de Bouillac, indiquant une réponse au stress oxydant ; 2/ une surexpression des gènes *rad51* et *gadd* dans le cerveau et dans l'appareil digestif après 3 et 7 jours d'exposition dans l'eau de Joanis, et dans le cerveau après 14 jours d'exposition dans l'eau de Bouillac. Ces résultats mettent en lumière une concomitance des effets génotoxique du cadmium et de la surexpression de gènes de réparation de l'ADN et de la neutralisation du stress oxydant.

La technique de la RAPD est plus sensible que le test des comètes puisque la première quantifie des dommages après exposition à une eau d'un site modérément contaminé (Bouillac) alors que la seconde ne détecte des dommages que dans des poissons exposés dans l'eau du site le plus contaminé (Joanis). L'intérêt de la RAPD-PCR est qu'elle peut être réalisée sur la totalité de l'organisme, et donc détecter des dommages apparaissant dans un seul tissu alors que le test des comètes exploite les seules cellules du sang. De même, le test comète révèle des effets clastogènes (cassures de l'ADN) alors que la RAPD révèle les effets mutagènes (modification de bases de l'ADN). Or, les modifications de bases apparaissent pour des concentrations de toxique bien inférieures à celles nécessaire pour générer des cassures de l'ADN.



## Genotoxic damages in zebrafish submitted to a polymetallic gradient displayed by the Lot River (France).

**Nicolas Orieux<sup>1</sup>,** Sébastien Cambier<sup>1</sup>, Patrice Gonzalez<sup>1</sup>, Bénédicte Morin<sup>2</sup>, Christelle Adam<sup>3</sup>, Jacqueline Garnier-Laplace<sup>3</sup>, and Jean-Paul Bourdineaud<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Bordeaux - CNRS, UMR EPOC 5805, Arcachon Marine Station, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France.

<sup>2</sup>Université de Bordeaux - CNRS, UMR ISM 5255, Groupe de Physico- et Toxicochimie de l'Environnement, 351 cours de la Libération, 33405 Talence Cedex, France.

<sup>3</sup>Laboratoire de Radioécologie et Ecotoxicologie, Institut de Radioprotection et Sûreté Nucléaire, Centre de Cadarache (IRSN), 13115 Saint-Paul-lez-Durance Cedex, France.

\* Corresponding author; Tel.: +33(0)556 22 39 26

fax: +33(0)556 54 93 83

E-mail address: [jp.bourdineaud@epoc.u-bordeaux1.fr](mailto:jp.bourdineaud@epoc.u-bordeaux1.fr)

**Key words:** *Danio rerio*, zebrafish, cadmium, zinc, bioaccumulation, genotoxicity, RAPD, ecotoxicology, genomic DNA, quantitative PCR.

*Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2011 May;74(4):974-83





## Genotoxic damages in zebrafish submitted to a polymetallic gradient displayed by the Lot River (France)

Nicolas Orieux <sup>a</sup>, Sébastien Cambier <sup>a</sup>, Patrice Gonzalez <sup>a</sup>, Bénédicte Morin <sup>b</sup>, Christelle Adam <sup>c</sup>, Jacqueline Garnier-Laplace <sup>c</sup>, Jean-Paul Bourdineaud <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Université de Bordeaux—CNRS, UMR EPOC 5805, Arcachon Marine Station, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France

<sup>b</sup> Université de Bordeaux—CNRS, UMR ISM 5255, Groupe de Physico- et Toxicochimie de l'Environnement, 351 cours de la Libération, 33405 Talence Cedex, France

<sup>c</sup> Laboratoire de Radioécologie et Ecotoxicologie, Institut de Radioprotection et Sûreté Nucléaire, Centre de Cadarache (IRSN), 13115 Saint-Paul-lez-Durance Cedex, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 August 2010

Received in revised form

7 January 2011

Accepted 16 January 2011

#### Keywords:

*Danio rerio*

Zebrafish

Cadmium

Zinc

Bioaccumulation

Genotoxicity

RAPD

Ecotoxicology

Genomic DNA

Quantitative PCR

### ABSTRACT

Genotoxic effects of a polymetallic pollution gradient displayed by the Lot River and one of its tributary have been assessed on zebrafish *Danio rerio*. Three methods were compared: RAPD-PCR, the comet assay, and 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) formation. The fishes were exposed for 14 days to waters collected from three stations: Joanis, a site polluted by cadmium (Cd) and zinc (Zn) (mean concentrations: 15 µg Cd/L and 550 µg Zn/L), Bouillac (mean concentrations: 0.55 µg Cd/L and 80 µg Zn/L), and Boisse-Penchot, a reference station (mean concentrations: < 0.05 µg Cd/L and 7 µg Zn/L). The quantitative RAPD-PCR methodology proved to be sensitive enough to unmask metal genotoxicity after 3 and 7 days of exposure to Joanis water and after 14 days to Bouillac water, whereas the comet assay only detected DNA damages at the most contaminated station (Joanis). The 8-oxodG quantification was not sensitive enough to be used in zebrafish under these environmental conditions.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Cadmium (Cd) is a highly toxic and carcinogenic heavy metal. This metal inhibits the DNA repair system and several enzymes involved in oxidative stress responses (Giagnini et al., 2006; Joseph, 2009). Cd is dispersed in the environment due to its widespread industrial use. In the South-West of France, the Lot River and its small tributary (Riou-Mort) have a polymetallic pollution gradient with Cd as the main toxic metal (Audry et al., 2004). These streams are polluted with cadmium and zinc originating from a century old industrial Zn factory, the Vieille-Montagne. Downstream on the Riou-Mort, just before its confluence with the river Lot, the cadmium concentration in the water varied between 2 and 28 µg/L during a 3-month survey (mean: 15 µg Cd/L). On the Lot River, about 300 m downstream from the confluence with the Riou-Mort (Bouillac sampling station), Cd concentrations varied from 0.05 to 2.5 µg/L (mean: 1 µg Cd/L) (Achard et al., 2004). In laboratory conditions, we

exposed zebrafish *Danio rerio* with environmentally relevant doses of Cd and found an induction of genes involved in the DNA repair process (Gonzalez et al., 2006). In order to assess the effectiveness of Cd-induced genotoxic damages on zebrafish we decided to use a modified RAPD-PCR methodology.

RAPD is currently used for intra-populational polymorphism detection, but the technique also permits the detection of genetic alterations after animal contamination with pollutants, even on non clonal species such as macroalgae *Palmaria palmata* (Atienzar et al., 2000), crustacean barnacles *Elminius modestus* (Atienzar et al., 2002), and bivalve mollusks *Mytilus edulis* (Hagger et al., 2005). Most recently, the RAPD methodology was applied to zebrafish to detect the genotoxic potential of chemicals such as cyclophosphamide and dimethoate (Zhiyi and Haowen, 2004). However, this method only relies on agarose gel electrophoresis analysis of the missing or appearing PCR products between DNA from contaminated and control individuals. We have recently refined this methodology by eliminating the electrophoretic analysis and taking advantage of the quantitative facilities of real-time PCR to address the efficiency of hybridization of the RAPD probe to genomic DNA, and to allow comparison of the melting temperature patterns between each amplification

\* Corresponding author. Fax: +33(0)556 54 93 83.

E-mail address: jp.bourdineaud@epoc.u-bordeaux1.fr (J.-P. Bourdineaud).

reaction (Cambier et al., 2010). Zebrafish were exposed for 21 days to two concentrations of cadmium chloride dissolved in the medium (1.9 and 9.6 µg/L, representative concentration present in the Bouillac and Riou-Mort waters, respectively). RAPD-PCR showed an increase in the relative hybridization efficiency of a Cd-discriminative probe on the genomic DNAs coming from fish exposed to both Cd concentrations as compared to the control condition. In addition, the RAPD-PCR melting temperature patterns showed that Cd contamination resulted in the variation of the distribution of PCR products according to their fusion temperature intervals.

A main objective of the present study is to determine whether this RAPD-PCR methodology can also apply to truly environmental situations, despite the numerous parameters that escape the researcher's control. We therefore decided to expose zebrafish for 14 days to different waters from the Lot River and its tributary, the Riou-Mort. Another objective of this study was to compare the sensitivity and efficiency of the RAPD-PCR methodology to those of two classic assays: the comet test (alkaline single cell gel electrophoresis) and the assessment of the oxidative DNA damage as measured by 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) using high pressure liquid chromatography (HPLC) analysis (Halliwell, 1999; Russo et al., 2004). Cd and Zn concentrations were quantified in fish tissues, and a selection of genes involved in DNA repair and response against stress were scrutinized for modification of their expression, in order to correlate with possible observed genotoxic damages.

## 2. Experimental section

### 2.1. Description of the study and sampling zone

The study and sampling zone was located in the South-West of France, in the Aveyron department of the Midi-Pyrénées region, on the banks of the Lot River and one of its metal-polluted tributary, the Riou-Mort River. This tributary is polluted by a zinc ore extraction plant located in Viviez, and which is now owned by the Umicore company. Today there is no more zinc extraction, but accumulated existing extracted materials still pollute the Riou-Mort River, mainly with cadmium and zinc. Three sampling stations were selected for our study (a figure of the site can be seen in Achard et al., 2004): (1) the Joannis station was located on the banks of the Riou-Mort station, 2 km upstream from the confluence with the Lot River and 2 km downstream from the Umicore factory. At this sampling site, the dissolved metal forms represented 92% and 89% of the total Cd and Zn, respectively (Andres et al., 2000); (2) the Bouillac station was located on the Lot River banks 200 m downstream from the confluence with the Riou-Mort River. At this sampling site, the dissolved metal forms represented 85% and 75% of the total Cd and Zn, respectively (Andres et al., 2000); (3) the Boisse-Penchot station was the reference site, located 3.5 km upstream from the confluence with the Riou-Mort River. At this sampling site, the Cd concentration was below the detection threshold of 0.05 µg/L.

### 2.2. Zebrafish care and contamination

The experiment lasted from May 3 to 18, 2010. On departure from Arcachon, fish were put in oxygen-saturated water, obtained by a direct bubbling of oxygen, and kept under a pure oxygen atmosphere for 4 h during the travel to Viviez. On arrival, fish were directly placed in a tank filled with chlorinated-free oxygenated water warmed to 23 °C. Fish were kept in this tank for 24 h and then transferred to experimental tanks. Since zebrafish cannot withstand low temperatures, we kept fish in tanks filled with water sampled from the 3 described sites at a constant temperature. The experiments were performed in a laboratory lent by the ABC factory in Viviez. Adult zebrafish were randomly distributed in three 60-L tanks equipped with a heater to maintain the water temperature at 25 ± 3 °C, and a bubbling device to oxygenate and mix the medium. Fish were fed daily with a quantity of dry food representing 5% of their body weight (Novo Gramomix, JBL). The food contained 38% proteins, 6% fat, 4% fibers, 9% ashes, 0.9% phosphorus, 25 IU/g of vitamin A, 0.4 mg/g vitamin C, 3 mg/g vitamin D3, and 0.33 mg/g vitamin E. Cd and Zn concentrations in this diet were measured and were equal to 2.7 ± 0.5 nmol Cd/g and 860 ± 33 nmol Zn/g, respectively. Tank water was renewed by a third of the total volume each day in order to get rid of the materials in suspension, including pieces of fish excrements, and to maintain the metal concentrations. Water renewal was performed by sampling 20 L each day

from each of the 3 sites, Boisse-Penchot, Bouillac, and Joannis. To avoid cold shock to fish, these cold waters were warmed to 25 °C before being poured into the tanks. Thirty-five fishes were harvested on days 3, 7, and 14 from the tank with the Boisse-Penchot water; on days 7 and 14 from the tank containing the Bouillac water; and on days 3 and 7 in the tank receiving the Joannis water. We supposed that 7 days of exposure to the Joannis water would be enough to see effects of metal contaminants in fish; whereas, 14 days would be necessary for fish cultured in Bouillac water. Zebrafish were killed within seconds by immersion in melting ice ( $T=0$  °C). This is in agreement with the ethical guidelines displayed and used by the NIH intramural research program (<http://ocau.od.nih.gov/ARAC/documents/Zebrafish.pdf>). Tissues were kept at -80 °C until used. Fish blood samples were collected from the caudal vein, diluted 100 times in a cryoprotective solution (250 mM sucrose, 40 mM citrate trisodium salt, 5% DMSO, pH adjusted to 7.6 with 1 M citric acid solution) and stored at -80 °C. Before starting the experiment, 3 fish were collected as controls for metal quantification and comet assay.

### 2.3. Cd and Zn analysis

Sampled tissues (skeletal muscles, digestive tract, gills, brain) were weighed and digested in 3 mL of concentrated nitric acid added to a pressurized medium (borosilicate glass tube) at 95 °C for 3 h. The resulting solutions were diluted to 15 mL with ultrapure water (MilliQ Plus, Millipore) and analyzed by atomic absorption spectrophotometry. The Cd determinations for water and digested tissue samples were performed with an atomic absorption spectrophotometer (M6 Solaar AA, Thermo Elemental) equipped with a graphite tube atomizer (GF95 Graphite Furnace). To avoid interference, the appropriate diluted solutions were analyzed in a tube atomizer with a mixture of Pd and Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. The detection limit was 0.05 µg Cd/L. Zinc concentrations for water and digested tissue samples were determined by flame atomic absorption spectrophotometry (Varian AA220FS). The detection limit was 10 µg Zn/L. The analytical methods were simultaneously validated for each sample series by the analysis of standard biological reference materials (TORT-2, lobster hepatopancreas; DOLT-2, dogfish liver; National Research Council of Canada, Ottawa). The results are expressed as average metal concentrations accumulated in tissues (in nmol Cd/g wet weight ± SD, and µmol Zn/g wet weight ± SD) for three samples from each tissue and sites.

### 2.4. Quantification of genotoxic damages by RAPD-PCR and analysis of the melting temperature curves of random amplified PCR products

After 3, 7, and 14 days of exposure, 10 fish were collected from the tanks, killed and stored at -20 °C until used. Genomic DNA isolation was performed by mincing frozen fish with a scalpel. Then crushed tissues were digested overnight at 50 °C with 10 mL per gram of tissue of DNA extraction buffer: 10 mM Tris pH 8, 100 mM EDTA pH 8, 0.5% SDS, and 200 µg/mL proteinase K (Promega). Then, the DNA solution was treated with 100 µg/mL RNase A (Qiagen) during 2 h at 37 °C. Genomic DNA was purified by a conventional phenol/chloroform method (Westerfield, 2007).

Primers used for RAPD-PCRs were the decamer oligonucleotides OPB7 (5'-GGTGACCGAG-3') and OPB11 (5'-GTAGACCCGT-3'), which were obtained from Sigma-Proligo. Real time RAPD-PCRs were done with the Lightcycler apparatus (Roche). Each reaction was completed to 20 µL (reaction volume) in a capillary tube in which 16 ng of genomic DNA were loaded, 2 µL of primer (6 µM), and 16 µL of PCR mix. The thermal program used for this real time RAPD-PCR was one warming step of 10 min at 95 °C followed by 50 amplification cycles at 95 °C for 5 s, 50 °C for 5 s, and 30 s at 72 °C. After this thermal program, the dissociation curves were obtained by following the decrease of SyberGreen fluorescence level during a gradual heating of the PCR products from 60 to 95 °C.

Melting temperature curves analysis was done using the LightCycler Software 3.5 (Roche). For a given RAPD-PCR capillary tube, the melting temperature ( $T_m$ ) of each PCR product peak was obtained in order to establish a distribution of the frequencies of appearance of peaks having equal  $T_m$  among a set of 10 different temperature intervals ranging from 78 to 89 °C. The comparison of distributions between two different exposure conditions designates temperature intervals for which the frequency of PCR products for a known  $T_m$  differed.

For each genomic DNA, quantitative analysis relied on the calculated difference in the cycle numbers necessary to enter in the exponential phase of the PCR,  $C_T$ , using probes OPB7 and OPB11, respectively. Indeed, OPB7 proved to be a reference probe, whereas OPB11 was a Cd contamination-sensitive probe (Cambier et al., 2010). This difference,  $\Delta = C_T(OPB7) - C_T(OPB11)$ , reflects the relative hybridization efficiency between the two probes, which can be calculated from  $2^{\Delta}$ . The value of this relative hybridization efficiency was calculated from the mean of ten replicates (the mean  $2^{[C_T(OPB7) - C_T(OPB11)]}$ ) for each experimental condition.

### 2.5. Comet assay

Comet assay was performed within two months on blood cells, according to the protocol of Devaux et al. (1997), a slightly modified version of the procedure

described by Singh et al. (1988). First of all, cell density in each sample was adjusted to about  $10^6$  cells per mL (dilutions were made in 10 mM PBS). Then, 75  $\mu$ L of each cell suspension was mixed with 75  $\mu$ L of 1% low melting point (LMP) agarose, pipetted over a microscope slide (previously coated with 1% normal melting point agarose), and covered by a coverslip. Slides were placed on a flat tray and kept on ice for 5 min until the agarose solidified. The coverslips were removed and 90  $\mu$ L of 0.5% LMP agarose was dispensed on the cell–agarose layer, covered by a coverslip and allowed to solidify on ice. The slides were immersed in a cold lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Triton X-100, pH set to 10 with NaOH) for 1 h at 4 °C. DNA was then allowed to unwind for 30 min in an alkaline electrophoresis solution (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13). Electrophoresis was performed under 0.7 V/cm and 300 mA current for 20 min. Slides were then neutralized with 0.4 M Tris pH 7.5, dehydrated for 10 min in absolute ethanol, and stored at room temperature before microscopic analysis. On the day of their microscopic observations, slides were stained with 50  $\mu$ L of 20  $\mu$ g/mL ethidium bromide. At least 100 nucleoids per slide were analyzed under a fluorescence microscope (Zeiss) equipped with a 350–390 nm excitation and 456 nm emission filter at 400 × magnification. Comet figures were analyzed by using Comet Assay software (Explora Nova, La Rochelle, France). Among all comet measurements provided by Explora Nova Comet Assay software, the olive tail moment (product of the tail length with the fraction of total DNA in the tail) was retained.

#### 2.6. Analysis of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine

In the field of 8-oxodG analyses, a technical difficulty is to avoid artifactual oxidation of nucleosides during DNA isolation from cells. There is indeed convincing evidence that substantial oxidation of guanine occurs during preparation of samples for HPLC analysis. The European Standards Committee on Oxidative DNA Damage (ESCODD) was set up in 1997 in order to identify the sources of artifacts, to develop standards and reliable techniques and to reach a consensus on the true background level of damage in normal cell. The extraction protocol used in this study was previously designed to minimize this effect and was successfully used during the ESCODD program (ESCODD, 2002a, 2002b).

The DNA extraction was conducted as follows. One fish was homogenized with 4 mL of lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 0.4 M NaCl, 1 mM deferoxamine mesylate pH 8, 0.5% Triton X-100) at 4 °C, using 8 strokes of a Potter-Elvehjem homogenizer for 1 min. After agitation, the nuclei were collected by centrifugation at 1200g for 5 min at 4 °C and washed with 5 mL Triton-free lysis buffer. To the nuclear pellet obtained by centrifugation (1200g for 5 min at 4 °C), was added 1 mL Triton-free buffer. The pellet was dispersed well by vigorous agitation and made up to 4.7 mL with buffer. 300  $\mu$ L of SDS 10% was added to the nuclear suspension to give a final concentration of 0.6%. The pellet must be well dispersed at this stage otherwise SDS will not lyse all the nuclear membrane. The tube was gently inverted several times to mix, and then incubated 10 min at 37 °C. Thereafter, 200  $\mu$ L RNase IIIA (1 mg/mL) in RNase buffer (10 mM Tris-HCl, 0.4 M NaCl, pH 8) and 10  $\mu$ L RNase T1 (1 U/ $\mu$ L in RNase buffer) were added and incubated for 30 min at 37 °C. Then, 1 mg of proteinase K was added prior to incubation for 30 min at 37 °C. The solution was cooled to room temperature and transferred to a stoppered glass tube. An equal volume of chloroform:isoamyl alcohol (24:1) was added. After 15 s of vigorous shaking, the solution was centrifuged for 10 min at 2400g at 20 °C with no brake. The upper phase was collected, taking care not to disturb the cloudy interface. The extraction step chloroform and isoamyl alcohol was repeated with the aqueous phase. The aqueous layer was transferred to a 15 mL Falcon tube and the volume was measured. 0.31 volume of 6 M NaCl was added, vortexed for 10 s and centrifuged for 10 min at 200g at room temperature. The supernatant was carefully decanted in a 15 mL tube and cooled on ice for 5 min. Two volumes of cold ethanol were then added. DNA precipitation was achieved by gently inverting the tube several times. The tube was left on ice for 10 min to aid precipitation of DNA. Then, the ethanol was removed and DNA was washed with 10 mL of ice-cold 70% ethanol, three times, removing ethanol by aspiration. Finally, DNA was recovered by centrifugation, and dissolved into 200  $\mu$ L of 10 mM Tris-HCl prior to DNA digestion. DNA concentration was quantified spectrophotometrically at 260 nm and its purity was assessed by ensuring that  $A_{260}/A_{280} > 1.75$ .

DNA was hydrolyzed as follows. DNA solution was incubated with 21  $\mu$ L of nuclease P1 buffer (300 mM sodium acetate and 1 mM ZnSO<sub>4</sub> pH 5.3) and 10  $\mu$ L (10 units) of nuclease P1 at 37 °C for 1 h. Dephosphorylation of the samples were achieved by the addition of 23  $\mu$ L of 500 mM Tris-HCl and 1 mM EDTA pH 8.0 buffer and 1  $\mu$ L (1 unit) of alkaline phosphatase at 37 °C for 30 min.

8-oxodG was quantified using a HPLC-electrochemical methodology. A Beckman Series pump system equipped with a pulse damper, a cooling autosampler and a spectrophotometric detector was connected to a Kontron amperometric detector. The electrochemical cell was equipped with a glassy carbon-working electrode, operated at 650 mV versus an Ag/AgCl reference electrode. The system was operated at 0.5 nA full range detection. The dG was detected at 254 nm. The HPLC separation was obtained on a Uptisphere ODB C18 column (5  $\mu$ m particule size, 250 mm × 4.6 mm) equipped with a Uptisphere ODB C18 guard column (5  $\mu$ m particule size, 50 mm × 4.6 mm; Interchim, Montluçon, France). The mobile phase used for isocratic elution of 8-oxodG was composed of 50 mM ammonium acetate pH 5.5 with 10% methanol at a flow rate of 0.8 mL/min and the injection volume was 100  $\mu$ L.

The concentration of dG was estimated from the UV peak and the concentration of 8-oxodG from the electrochemical signal. Results are expressed as the number of residues of 8-oxodG per 10<sup>6</sup> dG.

#### 2.7. Gene expression analysis

At day 3, 5 fish from each tank were dissected and sampled tissues (skeletal muscles, digestive tract, gills, brain) kept frozen in RNA-later (Qiagen) until used. At days 7 and 14, 5 fish from each tank were killed and stored at -80 °C until used. After thawing, fish were dissected and tissues sampled. Total RNAs were extracted from 40 mg of fresh tissue using the Absolutely RNA RT-PCR Miniprep kit (Stratagene), according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesized from 5  $\mu$ g total RNA using the Stratascript First-Strand Synthesis System (Stratagene), according to the manufacturer's instructions.

The accession numbers of the 10 genes used in our study and the corresponding primers have already been described (Gonzalez et al., 2006).

Real-time PCR reactions were performed in a LightCycler (Roche) as previously described (Gonzalez et al., 2006).

#### 2.8. Mathematical treatment

Significant differences in gene expression levels in gill, digestive apparatus, muscle and brain between Bouillac and Boisse-Penchot, and Joanis and Boisse-Penchot, were determined using the non-parametric Mann-Whitney *U*-test ( $p < 0.05$ ).

The statistical analysis done on the calculated relative hybridization efficiencies, and on the frequencies of the PCR products  $T_m$ , was performed with the non-parametric *U* Mann-Whitney test ( $p < 0.05$ ; Statistica 5.1). The statistical comparison of proportion was performed using binomial test.

For the comet assay, the statistical tests were run using the Statistica 6.1 software. Data normality was assessed using the Henry curve and variance homogeneity using the Bartlett test. A two-way ANOVA was then performed, followed by multiple comparisons using Tukey HSD tests.

Data obtained for the 8-oxodG were analyzed using the non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks (Statistica software 7.1).

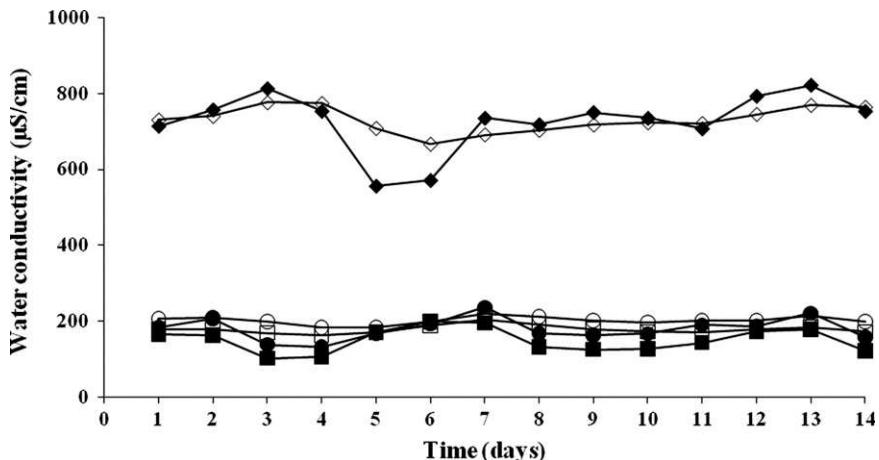
### 3. Results

#### 3.1. Physicochemical characteristics of sampling sites waters

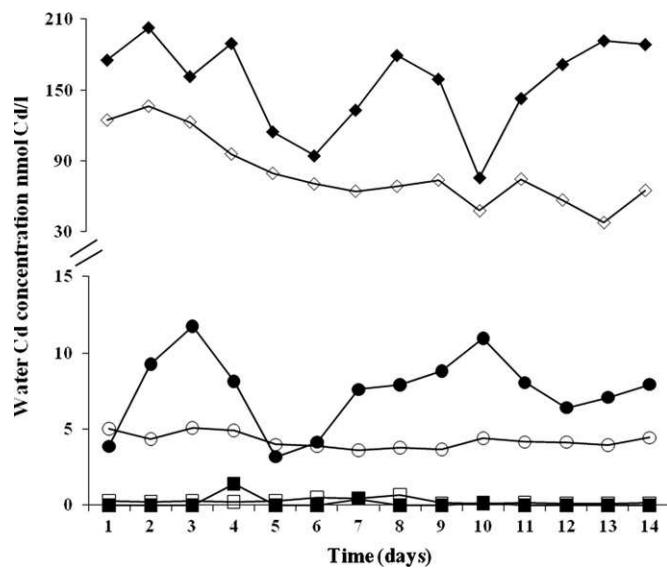
During the two weeks encompassing the experiment, the physicochemical constants of the water from each of the sampling sites and of the tanks were daily recorded. During 14 days, the mean pH for Boisse-Penchot was 7.97, 7.85 for Bouillac and 7.78 for Joanis. The same constancy was observed for temperature,  $25 \pm 3$  °C in tanks and  $13 \pm 1.5$  °C in sampling sites. Water conductivity, 180  $\mu$ S/cm, was in the expected range for a river such as the Lot River. In the Riou-Mort tributary at the Joanis site, water conductivity was high, and ranged between 550 to 800  $\mu$ S/cm (Fig. 1).

Cd and Zn concentrations were determined both in sampling site waters and in tanks. The decrease of Cd and Zn concentrations observed at days 6 and 10 (Figs. 2 and 3) in tanks and in sampling sites from Joanis can be explained by dilution from rains that happened on those precise days. At Joanis sampling site, Cd concentration varied between 203 and 76 nmol Cd/L (22.8 and 8.5  $\mu$ g Cd/L) over the two-week sampling period, whereas the corresponding tank values ranged between 136 and 38 nmol/L (15.3 and 4.3  $\mu$ g Cd/L; Fig. 2). At Bouillac sampling site, Cd concentrations varied from 3 to 12 nmol Cd/L (0.34 to 1  $\mu$ g/L) over the two-week sampling period, and in the corresponding tank the values ranged between 4 and 6 nmol Cd/L (0.45 and 0.67  $\mu$ g Cd/L). Cd concentration at Boisse-Penchot was below the detection threshold of 0.45 nmol Cd/L (0.05  $\mu$ g Cd/L).

At the Joanis sampling site, Zn concentrations were between 13.8 and 6.6  $\mu$ mol Zn/L (903 and 428  $\mu$ g Zn/L) over the two-week sampling period, whereas in the corresponding tank the values ranged between 6.7 and 10.0  $\mu$ mol Zn/L (440 and 651  $\mu$ g Zn/L; Fig. 3). At Bouillac sampling site, Zn concentration was varying from 0.44 to 2.06  $\mu$ mol Zn/L (29.8 and 135  $\mu$ g Zn/L) over the



**Fig. 1.** Water conductivity in river sites and in fish tanks. Water conductivity is given in  $\mu\text{S}/\text{cm}$  and was measured each morning on the Boisse-Penchot, Bouillac, and Joanis River sites represented respectively by black squares, circles, and diamonds. Water conductivity was also measured each evening in fish tanks containing Boisse-Penchot, Bouillac and Joanis waters represented respectively by open squares, circles, and diamonds.



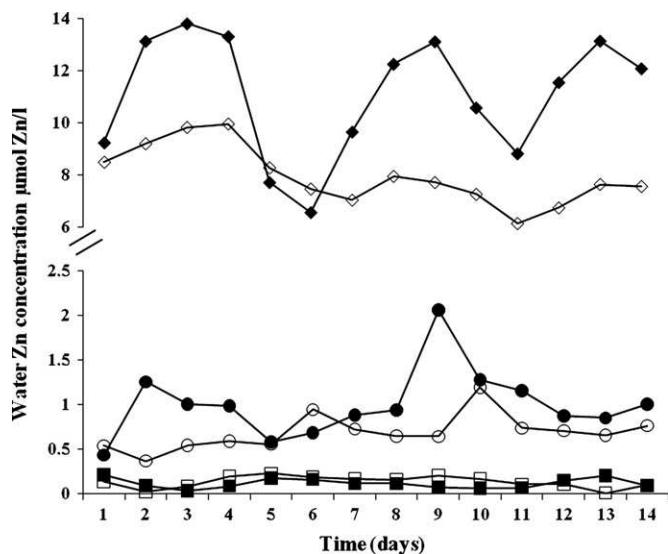
**Fig. 2.** Cadmium concentrations in River sites and in fish tanks. Cd concentrations are given in  $\text{nmol/L}$  and were measured each day from Rivers and fish tanks. Black squares, circles, and diamonds represent Cd water concentrations sampled in Boisse-Penchot, Bouillac and Joanis River sites. Open squares, circles, and diamonds represent Cd water concentrations in tanks filled with waters from Boisse-Penchot, Bouillac, and Joanis River sites. Considering concentration differences between Joanis and both Boisse-Penchot and Bouillac sites, the ordinate axis is separated to highlight two different concentration zones.

two-weeks sampling period, and in the corresponding tank the values ranged between 0.36 and 1.19  $\mu\text{mol Zn/L}$  (23 and 78  $\mu\text{g Zn/L}$ ). Zn concentrations at Boisse-Penchot were varying between 0.03 and 0.21  $\mu\text{mol Zn/L}$  (2.2 and 14  $\mu\text{g Zn/L}$ ).

Metal concentrations were lower in tanks than in waters from the corresponding sites, and this is most probably due to metal adsorption on tank walls, to fish which accumulate the metals and to biofilm development on the tank walls, since biofilms are well known to accumulate metal ions (Ivorra et al., 2002; Hill et al., 2000).

### 3.2. Cd and Zn bioaccumulation in fish organs

Zn and Cd concentrations were quantified in muscles, digestive tract, and gills. In the reference site water (Boisse-Penchot), the concentrations of Zn varied from 0.54  $\mu\text{mol/g}$  at day 3 to



**Fig. 3.** Zinc concentrations in river sites and in fish tanks. Zn concentrations are given in  $\text{nmol/L}$  and were measured each day from river and fish tanks sampling. Black squares, circles and diamonds represent Zn water concentrations sampled in Boisse-Penchot, Bouillac, and Joanis River sites. Open squares, circles, and diamonds represent Zn water concentrations in tanks filled with waters from Boisse-Penchot, Bouillac, and Joanis River sites. Considering concentration differences between Joanis and both Boisse-Penchot and Bouillac sites, the ordinate axis is separated to highlight two different concentration zones.

0.76  $\mu\text{mol/g}$  at day 14 in muscles (insignificant difference). Similar Zn concentrations were measured in the digestive tract, and around 2-times higher concentrations in the gills (Table 1). No significant differences could be observed between the Zn concentrations in muscles of fish cultured in waters from Bouillac, Joanis, and Boisse-Penchot (Table 1). In digestive tract and gills no differences were observed at any time between the Zn concentrations of the Boisse-Penchot and Bouillac fish. However, on day 3, significant Zn differences were measured for fish cultured in Joanis water as compared to Boisse-Penchot water in the digestive tract ( $0.78 \pm 0.17 \mu\text{mol/g}$  versus  $0.45 \pm 0.08 \mu\text{mol/g}$ ) and in gills ( $1.39 \pm 0.15 \mu\text{mol/g}$  versus  $0.92 \pm 0.08 \mu\text{mol/g}$ ). However, at day 7 these differences vanished, since the Zn concentrations in gills and in digestive tract decreased between 3 and 7 days of exposure to reach values close to those of fish cultures in Boisse-Penchot water.

**Table 1**  
Zinc concentrations in fish tissues.

	Day 3		Day 7			Day 14	
	BP <sup>a</sup>	Joanis	BP	Bouillac	Joanis	BP	Bouillac
Muscles	0.54 ± 0.11	0.56 ± 0.10	0.66 ± 0.08	0.73 ± 0.16	0.66 ± 0.15	0.76 ± 0.29	0.49 ± 0.08
Digestive tract	0.45 ± 0.08	0.78 ± 0.17*	0.53 ± 0.09	0.60 ± 0.08	0.55 ± 0.09	0.76 ± 0.15	0.43 ± 0.16
Gills	0.92 ± 0.08	1.39 ± 0.15*	1.03 ± 0.07	1.09 ± 0.24	1.02 ± 0.18	1.01 ± 0.25	0.72 ± 0.36

Concentrations are expressed in μmol/g fresh weight (± standard deviation, n=3). These concentrations must be compared to those found in tissues from fish cultured in their original tank in Arcachon before their transplantation to Viviez. We found 0.42 ± 0.13, 0.60 ± 0.06, and 0.93 ± 0.39 μmol/g in muscles, digestive tract and gills, respectively.

<sup>a</sup> BP stands for the reference station, Boisse-Penchot.

\* Statistically significant value as compared to the Boisse-Penchot reference (p < 0.05).

**Table 2**  
Cadmium concentrations in fish tissues.

	Day 3		Day 7			Day 14	
	BP <sup>a</sup>	Joanis	BP	Bouillac	Joanis	BP	Bouillac
Digestive tract	0.9 ± 0.4	4.6 ± 1.8*	0.4 ± 0.3	0.8 ± 0.6	1.0 ± 0.6	0.2 ± 0.2	1.0 ± 1.1
Gills	0.04 ± 0.04	1.9 ± 0.5*	0.10 ± 0.07	0.38 ± 0.16*	1.2 ± 0.5*	0.14 ± 0.13	0.40 ± 0.06*

Concentrations are expressed in nmol/g fresh weight (± standard deviation, n=3). These concentrations must be compared to those found in tissues from fish cultured in their original tank in Arcachon before their transplantation to Viviez. We found 1.0 ± 0.3 and 0.10 ± 0.10 nmol/g in digestive tract and gills, respectively.

<sup>a</sup> BP stands for the reference station, Boisse-Penchot.

\* Statistically significant value as compared to the Boisse-Penchot reference (p < 0.05).

° Statistically significant value as compared to Bouillac station (p < 0.05).

**Table 3**  
Cadmium and zinc bioaccumulation factors for fish cultured in Joanis water.

	Zn		Cd	
	Day 3	Day 7	Day 3	Day 7
Gills	154	114	13	8
Digestive tract	86	61	31	7

Bioaccumulation factors are calculated as the ratio of the metal concentration in the tissue over that in the medium water.

Cd concentrations were below the detection threshold in muscles for all waters in which fish were cultured. In digestive tracts, at day 3, Cd concentrations were very high among fish cultured in Joanis water compared to Boisse-Penchot (4.6 ± 1.8 nmol/g versus 0.9 ± 0.4 nmol/g) (Table 2). On day 7 the Cd concentration decreased sharply to 1.0 ± 0.6 nmol/g in digestive tracts of fish cultured in Joanis water. In gills, a net increase in Cd accumulations was observed for fish cultured in Joanis and Bouillac water compared to Boisse-Penchot (Table 2), the highest accumulations being associated with Joanis exposed fish, which contained 47 and 12-times more Cd than the gills of fish exposed to Boisse-Penchot water on days 3 and 7, respectively. The accumulations measured in gills of fish exposed to Bouillac water were less important, but still represented 4 and 3-times more Cd than in gills of fish exposed to Boisse-Penchot water at day 3 and 7, respectively. Bioaccumulation factors were calculated for gills and digestive apparatus of fish exposed to Joanis water at days 3 and 7 (Table 3). The values are much higher for Zn than for Cd in both tissues, and decrease between 3 and 7 days, although the contamination pressure remained constant, suggesting an adaptive response of fish against metal contamination.

### 3.3. Gene expression analysis

The basal relative gene expression in tissues from fish exposed to the reference Boisse-Penchot water show that the most expressed genes in tissues, among those tested, were the *coxl* and *sod* genes involved in mitochondrial respiration and defense against oxidative stress (Table 4). The genetic response to metal contaminants occurred early for fish cultured in Joanis water and was evident after 3 days of exposure in gills, brain, and muscles. In these fish, a delayed genetic response was observed in digestive tract with a net genetic response at day 7 (Table 5). The responsive genes were involved in mitochondrial respiration (the *coxl* gene was up-regulated 135- and 101-times in gills and brain, respectively), the neutralization of oxidative stress (the *sod* gene encoding the cytoplasmic Cu, Zn superoxide dismutase was up-regulated 5-, 70-, and 9-times in gills, brain and digestive apparatus, respectively, and the *sodmt* gene encoding the mitochondrial counterpart was up-regulated 77-times in brain). A detoxification device was stimulated with the up-regulation of the *tap* gene encoding an ABC-family transporter showing an 8-fold stimulation in muscles, and a tendency to stimulation, although not statistically significant, with 10-, 4-, and 5.5-fold increased expression in gills, brain, and digestive tract, respectively. DNA repair stimulation was evidenced with an up-regulation of the *rad51* gene, which was up-regulated 31-, 5-, and 7-times in brain, muscles, and digestive apparatus, respectively, along with a 25-fold up-regulation of the growth arrest and DNA damage *gadd* gene in brain.

For fish cultured in Bouillac water, a net genetic response was only observed after 14 days of exposure. Brains were especially responsive with the up-regulation of the antioxidant genes *sod* (× 1.5) and *sodmt* (× 2.5), the respiratory *coxl* gene (× 3.5), the metal responsive *mt1* gene (× 2.5), the apoptotic *bax* gene (× 5), and the DNA repair *gadd* gene (× 2.5). The up-regulation of *gadd*

**Table 4**

Basal expression of genes in various tissues from fish cultured in Boisse-Penchot water at day 3.

Function	Gene	Gills	Brain	Muscles	Digestive apparatus
Mitochondrial metabolism	<i>cox1</i>	6 ± 1.2	90 ± 9.7	5 ± 1.3	33 ± 6.9
Oxidative stress	<i>sod</i>	0.5 ± 0.01	0.4 ± 0.04	1 ± 0.2	0.4 ± 0.005
	<i>sodmt</i>	0.1 ± 0.02	0.9 ± 0.1	0.2 ± 0.05	0.2 ± 0.02
Detoxification	<i>mt1</i>	0.0006 ± 0.0001	0.06 ± 0.006	0.004 ± 0.001	0.03 ± 0.01
	<i>mt2</i>	0.06 ± 0.005	0.1 ± 0.007	0.1 ± 0.01	0.7 ± 0.3
	<i>tap</i>	0.003 ± 0.001	0.001 ± 0.0006	0.001 ± 0.001	0.007 ± 0.003
Apoptosis	<i>bax</i>	0.006 ± 0.0001	0.01 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.01 ± 0.006
DNA repair	<i>gadd</i>	0.02 ± 0.006	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.04	0.02 ± 0.005
	<i>rad51</i>	0.006 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.0007	0.007 ± 0.0003

Values are genes' expression relative to *b-actin* gene (mean, n=3).**Table 5**

Differential gene expressions in various tissues from fish cultured in Lot and Riou-Mort rivers' waters.

Tissue and function	Gene	Day 3	Day 7		Day 14
			Joanis	Bouillac	
<b>Gills</b>					
Oxidative stress	<i>sod</i>	5 ± 1.7*	=	=	=
	<i>sodmt</i>	19 ± 2.6	=	=	=
Mitochondrial metabolism	<i>cox1</i>	135 ± 54*	=	=	2.5 ± 0.3*
Detoxification	<i>mt1</i>	=	=	=	=
	<i>mt2</i>	42 ± 28	=	=	=
	<i>tap</i>	10 ± 5	=	=	=
Apoptosis	<i>bax</i>	4 ± 1	=	=	7 ± 1.6
DNA repair	<i>gadd</i>	=	=	=	3.5 ± 1*
	<i>rad51</i>	6 ± 2	=	=	=
<b>Brain</b>					
Oxidative stress	<i>sod</i>	70 ± 8.4*	=	1.5 ± 0.2*	1.5 ± 0.4*
	<i>sodmt</i>	77 ± 11*	=	=	2.5 ± 0.8*
Mitochondrial metabolism	<i>cox1</i>	101 ± 14*	=	=	3.5 ± 0.8*
Detoxification	<i>mt1</i>	=	=	=	2.5 ± 0.4*
	<i>mt2</i>	26 ± 17	=	=	=
	<i>tap</i>	4 ± 1	=	=	=
Apoptosis	<i>bax</i>	=	=	5 ± 1.4	5 ± 1.5*
DNA repair	<i>gadd</i>	25 ± 1.2*	=	=	2.5 ± 1*
	<i>rad51</i>	31 ± 5*	=	=	=
<b>Muscles</b>					
Oxidative stress	<i>sod</i>	0.7 ± 0.4	=	=	=
	<i>sodmt</i>	0.6 ± 0.08	=	=	=
Mitochondrial metabolism	<i>cox1</i>	0.6 ± 0.09	=	=	=
Detoxification	<i>mt1</i>	0.2 ± 0.02*	=	0.12 ± 0.05	10 ± 1.5*
	<i>mt2</i>	=	=	17 ± 3	=
	<i>tap</i>	8 ± 1*	=	=	=
Apoptosis	<i>bax</i>	=	=	=	=
DNA repair	<i>gadd</i>	0.2 ± 0.04	=	=	2.5 ± 1.5
	<i>rad51</i>	=	=	5 ± 1*	=
<b>Digestive tract</b>					
Oxidative stress	<i>sod</i>	=	=	9 ± 1.3*	2.5 ± 1.6
	<i>sodmt</i>	=	=	4.5 ± 1.5	2.5 ± 1.5
Mitochondrial metabolism	<i>cox1</i>	=	=	7.5 ± 2.7	8.5 ± 1.4
Detoxification	<i>mt1</i>	0.1 ± 0.05	=	=	=
	<i>mt2</i>	=	0.04 ± 0.01	5 ± 1.3	=
	<i>tap</i>	5.5 ± 1.5	=	=	=
Apoptosis	<i>bax</i>	=	=	7 ± 1.2	6 ± 2
DNA repair	<i>gadd</i>	0.09 ± 0.02	=	5.5 ± 1.2	6.5 ± 2.5
	<i>rad51</i>	=	0.1 ± 0.05	7 ± 1*	3 ± 1.3

The differential expression of a gene in a tissue is the ratio of its relative gene expression in fish cultured in the indicated site water over that of fish cultured in Boisse-Penchot water (mean, n=3).

= : identical to Boisse-Penchot.

\* Statistically significant differential expression ( $p < 0.05$ ).

**Table 6**  
Quantification of genotoxic effects by RAPD-PCR.

	Day 3		Day 7			Day 14	
	BP <sup>a</sup>	Joanis	BP	Bouillac	Joanis	BP	Bouillac
$C_T(OPB7)^b$	21.8 ± 0.2	23.5 ± 0.2	22.3 ± 0.3	22.3 ± 0.3	22.2 ± 0.2	22.7 ± 0.1	22.0 ± 0.1
$C_T(OPB11)^b$	30.6 ± 0.2	33.8 ± 0.2	33.8 ± 0.5	34.1 ± 0.5	32.7 ± 0.2	33.6 ± 0.3	30.7 ± 0.3
$\Delta^c$	-8.8 ± 0.2	-10.3 ± 0.2*	-11.4 ± 0.6	-11.8 ± 0.4	-10.5 ± 0.2°	-10.9 ± 0.4	-8.7 ± 0.3*
Relative hybridization efficiency <sup>d</sup>							
$\times 10^5$	257 ± 44	88 ± 15*	56 ± 11	38 ± 9	77 ± 11°	77 ± 30	269 ± 39*

<sup>a</sup> BP stands for the reference station, Boisse-Penchot.

<sup>b</sup> Numbers given are the means (± SEM) of cycles necessary to enter in exponential amplification phase (cycle threshold,  $C_T$ ) done on 10 different zebrafish genomic DNA with oligonucleotides OPB7 or OPB11.

<sup>c</sup>  $\Delta = C_T(OPB7) - C_T(OPB11)$ .

<sup>d</sup> The relative hybridization efficiency of the OPB11 probe is calculated by the formula  $2^\Delta$  (means ± sem, n=10 unless for Bouillac DNA samples at day 7 where n=9).

\* Statistically significant value as compared to the Boisse-Penchot reference values ( $p < 0.05$ ).

° Statistically significant value as compared to Bouillac water-exposed fish ( $p < 0.05$ ).

gene was also observed in gills ( $\times 3.5$ ) and in digestive tracts (a 6.5-times statistically insignificant tendency).

#### 3.4. Genotoxic impact of the polymetallic gradient

RAPD-PCRs were performed on genomic DNAs extracted from ten individuals cultured in waters from Boisse-Penchot, Bouillac and Joanis sites. The OPB7 probe was used as a reference because we have previously shown that it did not discriminate between genomic DNAs coming from control or Cd-exposed fish, contrary to the OPB11 probe (Cambier et al., 2010). The use of real time quantitative RAPD-PCR allowed calculation of the mean cycle numbers necessary to enter into the exponential phase of amplification,  $C_T$ , for each of ten genomic DNAs. For each exposure condition, using OPB7 and OPB11 probes, the difference  $\Delta = C_T(OPB7) - C_T(OPB11)$  reflects the difference of the hybridization efficiencies between OPB7 and OPB11 probes on the genomic DNAs (Table 6). It can be calculated from  $2^\Delta$  for each exposure. For instance, for the ten fish cultured in Boisse-Penchot water, on day 3, the mean cycle number difference  $\Delta$  is  $-8.8 \pm 0.2$ , therefore, genomic DNAs are presenting 389-times ( $2^{-8.8}$ ) more hybridization sites for OPB7 than for OPB11 probe. Results collected in Table 6 show a significant 2.9-fold decrease in the hybridization efficiency of OPB11 relative to OPB7 on genomic DNAs coming from fish exposed to Joanis water for 3 days compared to fish cultured in Boisse-Penchot water ( $p < 0.05$ ), and a 3.5-fold increased relative hybridization efficiency on genomic DNAs coming from fish exposed to Bouillac water for 14 days ( $p < 0.05$ ). At day 7, there was a significant 2-fold difference in the relative hybridization efficiencies between genomic DNAs from fish exposed to Bouillac and to Joanis waters ( $p < 0.05$ ).

Melting temperature ( $T_m$ ) curve profiles obtained from each RAPD-PCR were analyzed, and the frequency of appearance of a melting peak in each of 10 temperature intervals between 78 to 89 °C were recorded (Table 7). The inter-individual genetic polymorphism was immediately apparent, because if all fish were genetically identical, the frequencies of peak distribution among the temperature intervals would equal 0 or 1 for each temperature class, which was not the case. The RAPD-PCR methodology was set up exactly for such a purpose, i.e. to determine genetic polymorphism among a population, but a significant variation of a peak frequency in a temperature class between samples coming from two different exposures can highlight the apparition of PCR products with different  $T_m$ , and thus with different nucleotides composition, indicating the creation or the loss of hybridization sites for the probe.

**Table 7**

Frequency, according to the temperature intervals (°C) to which their  $T_m$  belong, of the PCR products obtained with OPB7 and OPB11 on 10 individual genomic DNAs from zebrafish cultured in Lot and Riou-Mort Rivers' waters.

Probe and temperature intervals <sup>a</sup>	Day 3		Day 7		Day 14		
	BP <sup>b</sup>	Joanis	BP	Bouillac <sup>c</sup>	Joanis	BP	Bouillac
<b>OPB11</b>							
[78-80[	0.5	0.7	0.3	0.56	0.3	0.5	0.5
[80-81[	0.1	0.1	0	0	0.2	0.2	0
[81-82[	0.1	0.1	0.3	0.22	0.4	0.2	0.2
[82-83[	0.7	0.9	0.5	0.56	0.5	0.5	0.4
[83-84[	0.5	0.2	0.2	0.33	0.7*	0.2	0.6
[84-85[	0	0.2	0.1	0	0	0.2	0.1
[85-86[	0.5	0.2	0.5	0.67	0.8	0.6	0.5
[86-87[	0.4	0.7	0.4	0.22	0.2	0.3	0.4
[87-88[	0.3	0	0.1	0.11	0.1	0.2	0.2
[88-89[	0	0	0	0	0	0	0
<b>OPB7</b>							
[78-80[	0	0	0	0	0	0	0
[80-81[	0	0	0.1	0.22	0.2	0.1	0
[81-82[	1	1	0.9	0.78	0.8	0.9	1
[82-83[	0	0	0	0	0	0	0
[83-84[	0	0	0.1	0.22	0	0	0.2
[84-85[	0.8	0.8	0.7	0.11	0.8	0.9	0.6
[85-86[	0	0	0.1	0.44	0	0	0.3
[86-87[	1	1	0.9	0.56	1	0.9	0.7
[87-88[	0	0	0	0	0	0	0.1
[88-89[	1	0.9	1	1	1	1	0.8

<sup>a</sup> When writing the temperature interval  $[T_1-T_2]$ , the brackets are not parenthesis but rather the mathematical symbols meaning that the  $T_1$  temperature is included within the interval whereas the  $T_2$  temperature is excluded from the interval. Thus, the  $T_2$  temperature belongs to the next interval.

<sup>b</sup> BP stands for the reference station, Boisse-Penchot.

<sup>c</sup> For Bouillac water at day 7, only 9 zebrafish genomic DNA were extracted.

\* The asterisk means a statistically significant differential frequency as compared to the Boisse-Penchot reference ( $p < 0.05$ ).

When comparing the frequency distribution of PCR products'  $T_m$  among the temperature intervals obtained with the OPB7 probe between Boisse-Penchot and Joanis or Bouillac fish genomic DNAs, no significant differences were observed at any time, as expected with a non-discriminative primer (Table 7). Therefore, the OPB7 probe is able to highlight the inter-individual genetic polymorphism but not the Cd and Zn genotoxic impact. When using the OPB11 probe, the frequency distribution was quite different between Boisse-Penchot and Joanis water-exposed fish

**Table 8**

DNA damages (olive tail moment) in erythrocytes of zebrafish exposed to Lot and Riou-Mort Rivers' waters.

Day 0	Day 3			Day 7		Day 14			
	BP <sup>a</sup>	BP	Joanis	BP	Bouillac	Joanis	BP	Bouillac	
OTM <sup>b</sup>	59 ± 20 (3)	36 ± 14 (6)	68 ± 16 (6)*	35 ± 14 (3)	39 ± 1 (3)	40 ± 19 (6)	21 ± 14 (6)	13 ± 9 (4)	42.3 ± 0.2 (2)

<sup>a</sup> BP stands for the reference station, Boisse-Penchot.<sup>b</sup> OTM: olive tail moment. Numbers given are the mean ± standard error. Between parentheses are indicated the number of replicates.\* Statistically significant different olive tail moment in DNA fish exposed to Joanis water compared to Boisse-Penchot ( $p < 0.05$ ).**Table 9**

8-oxodG analysis by HPLC.

	Day 3		Day 7		Day 14		
	BP <sup>a</sup>	Joanis	BP	Bouillac	Joanis	BP	Bouillac
8-oxodG/10 <sup>6</sup> dG	18.8 ± 16.4	9.3 ± 6.2	6.0 ± 3.9	4.4 ± 1.8	4.2 ± 0.7	3.7 ± 1.7	2.3 ± 0.9

<sup>a</sup> BP stands for the reference station, Boisse-Penchot. Values represent the mean ± SD of three samples.

genomic DNAs at day 7. An increased frequency of PCR products occurred within the [83–84 °C] temperature interval. Only 2 out of 10 Boisse-Penchot fish DNA versus 7 out of 10 Joanis water-exposed fish DNA presented a melting peak in this interval. The statistical significance between Boisse-Penchot and Joanis water-exposed conditions was assessed by a Kruskal-Wallis followed by a Mann-Whitney U test showing that the [83–84 °C] interval indeed discriminated Boisse-Penchot and Joanis-exposed fish genomic DNAs ( $p < 0.05$ ). The [85–86 °C] interval presented an increase in the frequency of PCR products between Boisse-Penchot and Joanis group at day 7; however, it was not significant,  $p > 0.05$ . Therefore, the OPB11 probe is able to significantly distinguish the metal genotoxic impact over the inter-individual genetic polymorphism background.

The comet assay was performed on fish blood samples, at the beginning of the experiment, and at days 3, 7, and 14 (Table 8). A statistically significant increase of DNA damage was observed on day 3 ( $p=0.02$ ) in fish exposed at the most contaminated station, Joanis. After 7 days of exposure, no significant difference in DNA damage was detected at any of the three stations. On day 14 an increase of olive tail moment was observed at Joanis station, although statistical tests failed to find any significant difference. It must be noted that DNA damages in the control group were quite high at the beginning of the experiment and then slightly decreased until day 14, where the DNA damages were in the range of values already observed for control zebrafish erythrocytes by Barillet et al. (2005). These authors found a comet tail length of ca. 29 ± 7 µm comparable to our tail length mean value of 41 ± 17 µm.

The analysis of 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine was used to assess genotoxic damages due to reactive oxygen species formation. No significant variation in 8-oxodG formation was observed when fishes were exposed to the different water sites (Table 9). A decrease in the level of 8-oxodG in DNA from fish exposed to Boisse-Penchot water was observed between 3 and 7 days, but this was not statistically significant.

#### 4. Discussion

The zinc accumulation pattern in fish tissues suggests the intervening action of strong homeostatic mechanisms to limit gross variations of Zn in the organisms. Indeed, although the Zn concentration in Joanis water-filled tank was at least 40-times

higher than that of the Boisse-Penchot tank, we noted on day 3 a significant yet modest increase in Zn concentrations in the digestive tract ( $1.7 \times$ ) and in gills ( $1.5 \times$ ) from fish cultured in Joanis water compared to Boisse-Penchot fish. If we compare the gills metal bioaccumulation factors observed in this study to those described in roaches *Rutilus rutilus* caught in the Riou-Mort River near to the Joanis site (Andres et al., 2000), we note a similar value for Zn (114 versus 167) but a much lower value for Cd (8 versus 333). This is probably due to the fact that in the present study fish were only exposed for 7 days to Joanis water, whereas roaches had been residing for months in Riou-Mort River before being caught, and this highlights the homeostatic trend regulating the Zn concentrations in fish tissues.

Contrary to the laboratory exposure in which we noticed a mortality reaching 4% after 3 days and 56% after 21 days in a water containing 9.6 µg Cd/L (a concentration similar to that of Joanis water), no fish loss was recorded after 7 days in Joanis water, and this indicates that the quality of water, i.e. the various mineral elements present, somehow protect fish against the deleterious effects of cadmium or allow a better adaptive response. In fact, the zinc concentration might well be protective, except at 3 days of exposure to Joanis water, because first, Zn concentrations returned to homeostatic levels at day 7 and thereby could not exert toxic influence anymore, and second, zinc is known to display anti-inflammatory and antioxidant roles (Prasad, 2008).

The cadmium accumulation in tissues from fish grown in natural waters displayed a much different pattern than those generated after laboratory exposure to well defined medium. We found in the present study a greater decrease in Cd concentrations than in laboratory conditions. After 7 days of laboratory exposure to 9.6 µg Cd/L, a concentration similar to that of Joanis water, fish gills accumulated 14-times more than after 7 days of culture in Joanis water (Gonzalez et al., 2006). The lower Cd accumulation could be explained by a competition exerted by Zn ions on the entry of Cd ions through the same transporters (since the molar ratio Zn/Cd reaches a value of around 90 in Joanis water) or the stimulation of detoxification devices such as an increased expression of ABC transporters. In keeping with such a view, the *tap* gene encoding an ABC transporter similar to the MDR1 (multidrug resistance protein) transporter was significantly up-regulated 8-times in muscles, and we noted a tendency for up-regulation in gills ( $10 \times$ ), brain ( $4 \times$ ) and in digestive tract ( $5.5 \times$ ). The onset of an adaptive response is likely to explain why Cd and Zn concentrations decreased in gills between 3 and 7 days of

exposure to Joanis water and why Cd concentration stagnated in gills between 7 and 14 days of exposure to Bouillac water. The same decrease of Cd concentration in gills was observed in the laboratory between 7 and 21 days of exposure to 9.6 µg/l accompanied by a 100-fold up-regulation of *tap* gene (Gonzalez et al., 2006).

The comet assay revealed damages to DNA from fish cultured in the most contaminated station as illustrated by an increase of the olive tail moment at day 3 in Joanis water, whereas at day 7, these damages were apparently repaired. Again, at day 14, an increase of DNA damages was observed at this station. The RAPD-PCR methodology highlighted DNA attacks for fish cultured in Joanis water after 3 and 7 days and in Bouillac water for 14 days. The gene expression patterns are supporting these genotoxicity results since: (1) the *sod* genes were up-regulated at day 3 in gills and brain (Joanis exposure), at day 7 in digestive tract (Joanis exposure), and at day 14 in brain (Bouillac exposure), indicating a response against oxidative stress, a stress well known to produce DNA damage, and a hallmark of Cd contamination (Bagchi et al., 2000; Wang et al., 2004); (2) the *rad51* and *gadd* genes, involved in DNA repair were up-regulated at day 3 in brain (Joanis exposure), at day 7 in digestive tract (Joanis exposure), and at day 14 in gills and brain (Bouillac exposure); (3) there is a simultaneous onset of both genotoxic damages and up-regulation of genes involved in DNA repair and oxidative stress neutralization.

The comparison of results obtained with the comet assay and the RAPD-PCR methodology indicates the same trend: early DNA damages after 3 days, followed by a slight decrease after one week evidenced only by RAPD-PCR and finally, later DNA damages after two weeks. Simultaneously, the up-regulation of genes related to oxidative stress defense and DNA repair was observed, which could explain the slight decrease observed after one week.

The genotoxicity of Cd is well known since it is classified by the International Agency for Research on Cancer as carcinogen of category 1. Its genotoxicity is likely to be due to oxidative stress, but produced from indirect processes as a decrease of cellular antioxidants rather than directly from Fenton type reactions. However, several authors have also shown that Cd perturbs DNA repair systems dealing with damage involving one DNA strand (Bertin and Averbeck, 2006). This latter mechanism could explain why DNA damages occurred again after two weeks.

When considering the relative hybridization efficiency of OPB11 probe, data revealed a 2.9-fold decreased efficiency in Joanis water-exposed fish DNA for 3 days, and a 3.5-fold increased efficiency in Bouillac water-exposed fish DNA for 14 days. One may hastily conclude that the results represent a discrepancy in the data and unreliable methodology when using the RAPD-PCR technique to quantify genotoxic damages. Our previous conclusions (Cambier et al., 2010) apply equally well for the present situation: "it should be reminded that the probe hybridization efficiency on a contaminated fish DNA as compared to a control DNA is the resultant of both creation and elimination of hybridization sites since for instance discrete base pair substitution can make appear or disappear such sites. Therefore, DNA insults will not necessarily increase the number of probe hybridization site. We can even imagine situations where the sum of created and lost sites will favor the latter, and situations for which the number of created sites could be compensated for by that of lost sites." In the present study, the last occurrence can be exemplified by similar relative hybridization efficiencies of OPB11 probe to DNA from fish exposed to Joanis and Boisse-Penchot waters at day 7. Two results show that indeed the DNA alterations borne by Joanis fish DNA are masked: first, at day 7, there was a significant 2-fold difference in the relative hybridization efficiency of OPB11 probe between genomic DNAs from fish exposed to Bouillac and to

Joanis waters; second, we noticed an increase of the frequency of the PCR products in the [83–84 °C] melting temperature interval at day 7 when comparing Joanis water-exposed and Boisse-Penchot water-exposed fish. This indicated PCR products with different  $T_m$  value and therefore composed of different nucleotides and amplified from different probe's hybridization sites. This illustrates that the quantification of the probe's hybridization sites and the analysis of the melting temperature curves were complementary data.

An apparently puzzling result is the 4.5-fold drop in the number of OPB11 probe's hybridization sites of Boisse-Penchot water-exposed fish DNA between 3 and 7 days. This probably means that the fish DNA had already been altered at the beginning of the exposures. We think this is due to the fact that fish were transported for several hours from Arcachon to Viviez in firmly tighten plastic bags of which the water was saturated by bubbling pure oxygen and the atmosphere filled with pure oxygen. Indeed, hyperoxia or hyperbaric molecular oxygen is known to promote oxidative DNA damages (Speit et al., 2002). The comet assay shows that upon arrival to Viviez, the olive tail moment reached 59 whereas after 14 days of culture in the Boisse-Penchot water, it had decreased to 21, (Table 8) meaning that fish DNA recovered from molecular oxygen-triggered damages in the Lot River water. This trend was also observed for the 8-oxoG formation. A decrease was shown in zebrafish oxidative DNA damage after 14 days of exposure to Boisse-Penchot water (from 18.8 8-oxoG/10<sup>6</sup> dG at day 3 down to 3.7 at day 14) although that was not statistically significant due to a large inter-individual variability of 8-oxoG levels in zebrafish DNA at day 3 (Table 9). We verified in laboratory conditions that indeed the application of pure molecular oxygen to zebrafish for hours triggered DNA alterations resulting in the modifications of the number of RAPD-PCR probe's hybridization sites (data not shown).

Comet assay, RAPD-PCR methodology and 8-oxo-guanosine quantification are complementary as they are not indicative of the same damages: while the comet assay, under alkaline conditions, indicates DNA single and double-strand breaks and alkali labile sites (capable of being transformed into single strand breaks under alkaline conditions), the RAPD-PCR can detect subtle modifications such as base pair substitutions, thus revealing mutagenic events ; 8-oxo-guanosine is a typical oxidatively generated mutagenic lesion. The results obtained here indicate that RAPD-PCR was more sensitive than the comet assay, as it detected genotoxicity at the intermediary contamination station (Bouillac), whereas the comet assay detected genotoxicity only at the most contaminated station. In our conditions, 8-oxo-guanosine quantification was not sufficiently sensitive to detect an effect. It should also be stressed that the comet assay only requires blood samples (which represents a non-invasive method for bigger fish); whereas, RAPD-PCR are performed on genomic DNA extracted from whole fish, and therefore are likely to detect modifications borne by tissues other than blood. These last two methods, with similar sensitivity, can be used in complement, as the comet assay is indicative of clastogenic events, while the RAPD-PCR reveals mutagenicity, and is therefore more prone to assess toxicant effects at very low doses. Furthermore, because of its simplicity and large applicability to any eucaryotic cell, the comet assay can be used as a screening method, whereas RAPD-PCR is particularly useful in detecting mutagenicity at low doses.

## 5. Conclusions

When applied to an *in situ* environmental situation in which zebrafish were transported to a polymetallic pollution gradient along the Lot River and one of its tributaries, genotoxic alterations on genomic fish DNA could be detected after a few days of exposure.

The quantitative RAPD-PCR methodology proved to be sensitive enough to unmask metal genotoxicity after 3 and 7 days of exposure to Joanis water and after 14 days of exposure to Bouillac water, whereas the comet assay only detected DNA damages at the most contaminated station (Joanis). The 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine quantification was not sensitive enough to be used in zebrafish under these environmental conditions.

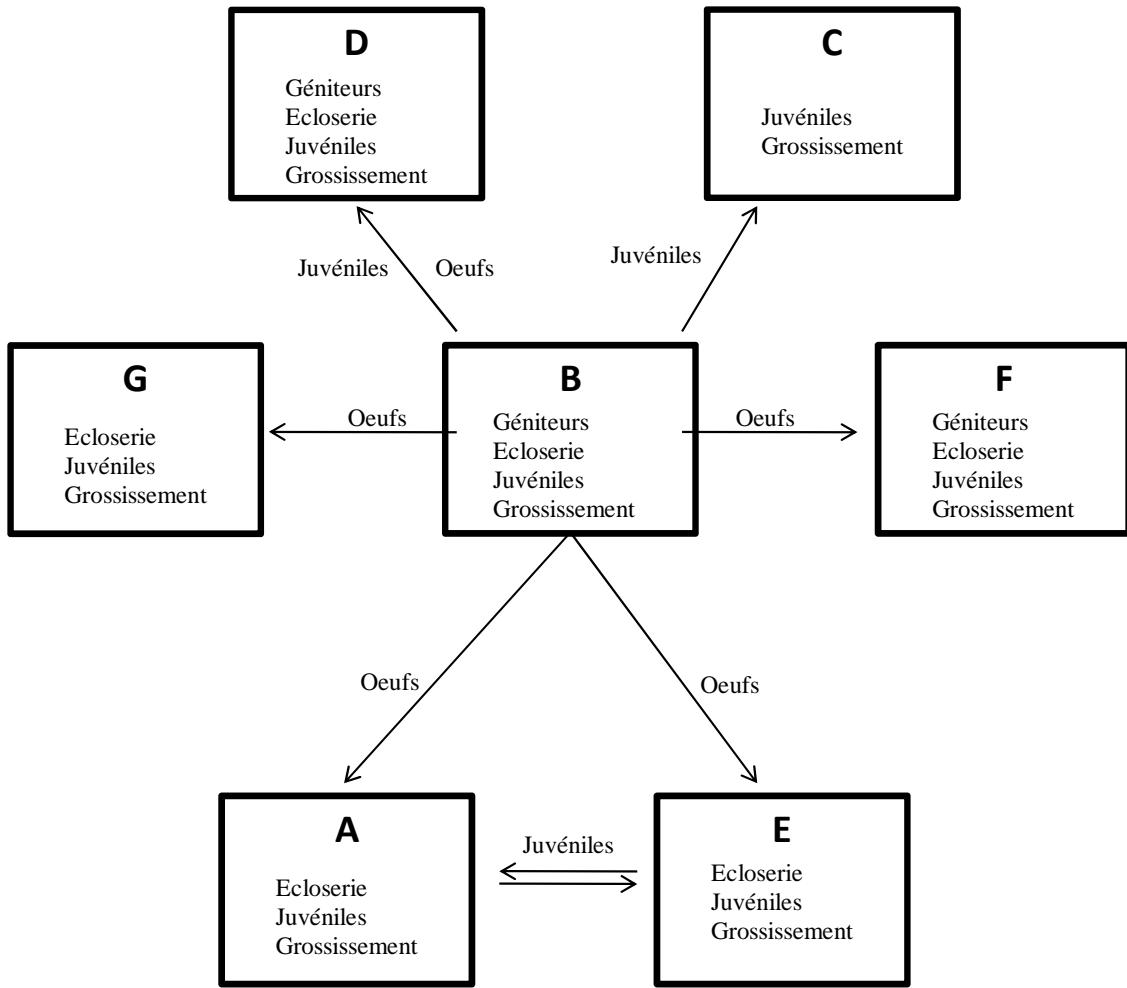
## Acknowledgments

We thank Damien Baudifffier for its technical contribution to the gene expression analysis, Isabelle Cavalié for the comet assay, and Tom Hinton for English language corrections. We thank the ABC factory direction to have lent us a laboratory in which zebrafish exposures were performed. This work was funded by CNRS and the University of Bordeaux 1.

## References

- Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P., 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquat. Toxicol.* 67, 347–357.
- Andres, S., Ribeyre, F., Tourenq, J.N., Boudou, A., 2000. Interspecific comparison of cadmium and zinc contamination in the organs of four fish species along a polymetallic pollution gradient (Lot River, France). *Sci. Total Environ.* 248, 11–25.
- Atienzar, F.A., Cordi, B., Donkin, M.E., Evenden, A.J., Jha, A.N., Depledge, M.H., 2000. Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palmaria palmata*. *Aquat. Toxicol.* 50, 1–12.
- Atienzar, F.A., Billinghurst, Z., Depledge, M.H., 2002. 4-n-Nonylphenol and 17-beta estradiol may induce common DNA effects in developing barnacle larvae. *Environ. Pollut.* 120, 735–738.
- Audry, S., Blanc, G., Schafer, J., 2004. Cadmium transport in the Lot-Garonne River system (France)—temporal variability and a model for flux estimation. *Sci. Total Environ.* 319, 197–213.
- Bagchi, D., Joshi, S.S., Bagchi, M., Balmoori, J., Benner, E.J., Kuszynski, C.A., Stohs, S.J., 2000. Cadmium- and chromium-induced oxidative stress, DNA damage, and apoptotic cell death in cultured human chronic myelogenous leukemic K562 cells, promyelocytic leukemic HL-60 cells, and normal human peripheral blood mononuclear cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14, 33–41.
- Barillet, S., Buet, A., Adam, C., Devaux, A., 2005. Does uranium exposure induce genotoxicity in the teleostean *Danio rerio*? First experimental results. *Radio-protection Suppl.* 1 (40), S175–S181.
- Bertin, G., Averbeck, D., 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* 88, 1549–1559.
- Cambier, S., Gonzalez, P., Durrieu, G., Jean-Paul Bourdineaud, J.-P., 2010. Cadmium-induced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 312–319.
- Devaux, A., Pesonen, M., Monod, G., 1997. Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. *Toxicol. in Vitro* 11, 71–79.
- ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage), 2002a. Inter-laboratory validation of procedures for measuring 8-oxo-7, 8-dihydroguanine/8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine in DNA. *Free Radical Res* 36, 239–245.
- ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage), 2002b. Comparative analysis of baseline 8-oxoguanine in mammalian cell DNA, by different methods in different laboratories; an approach to consensus. *Carcinogenesis* 23, 2129–2133.
- Giaginis, C., Gatzidou, E., Theocharis, S., 2006. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 213, 282–290.
- Gonzalez, P., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P., 2006. Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *Biometals* 19, 225–235.
- Hagger, J.A., Atienzar, F.A., Jha, A.N., 2005. Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc, *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 74, 205–217.
- Halliwell, B., 1999. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat. Res.* 443, 37–52.
- Hill, W.R., Bednarek, A.T., Larsen, I.L., 2000. Cadmium sorption and toxicity in autotrophic biofilms. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57, 530–537.
- Ivorra, N., Barranguet, C., Jonker, M., Kraak, M.H.S., Admiraal, W., 2002. Metal-induced tolerance in the freshwater microbenthic diatom *Gomphonema parvulum*. *Environ. Pollut.* 116, 147–157.
- Joseph, P., 2009. Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 272–279.
- Prasad, A.S., 2008. Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. *Exp. Gerontol.* 43, 370–377.
- Russo, C., Rocco, L., Morescalchi, M.A., Stingo, V., 2004. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 168–174.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- Speit, G., Dennog, C., Radermacher, P., Rothfuss, A., 2002. Genotoxicity of hyperbaric oxygen. *Mutat. Res.* 512, 111–119.
- Wang, Y., Fang, J., Leonard, S.S., Rao, K.M., 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radical Biol. Med.* 36, 1434–1443.
- Westerfield, M., 2007. The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), fourth ed. University of Oregon Press, Eugene.
- Zhiyi, R., Haowen, Y., 2004. A method for genotoxicity detection using random amplified polymorphism DNA with *Danio rerio*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58, 96–103.





**Fig. 18.** Réseau technico-économique des aquacultures d'Aquitaine choisies pour cette étude. Les 7 sites sont nommés par une lettre en gras. Ils sont interconnectés par le commerce et l'échange d'œufs et d'alevins qui sont indiqués au-dessus des flèches. Pour chaque aquaculture, le type d'activité est aussi indiqué.

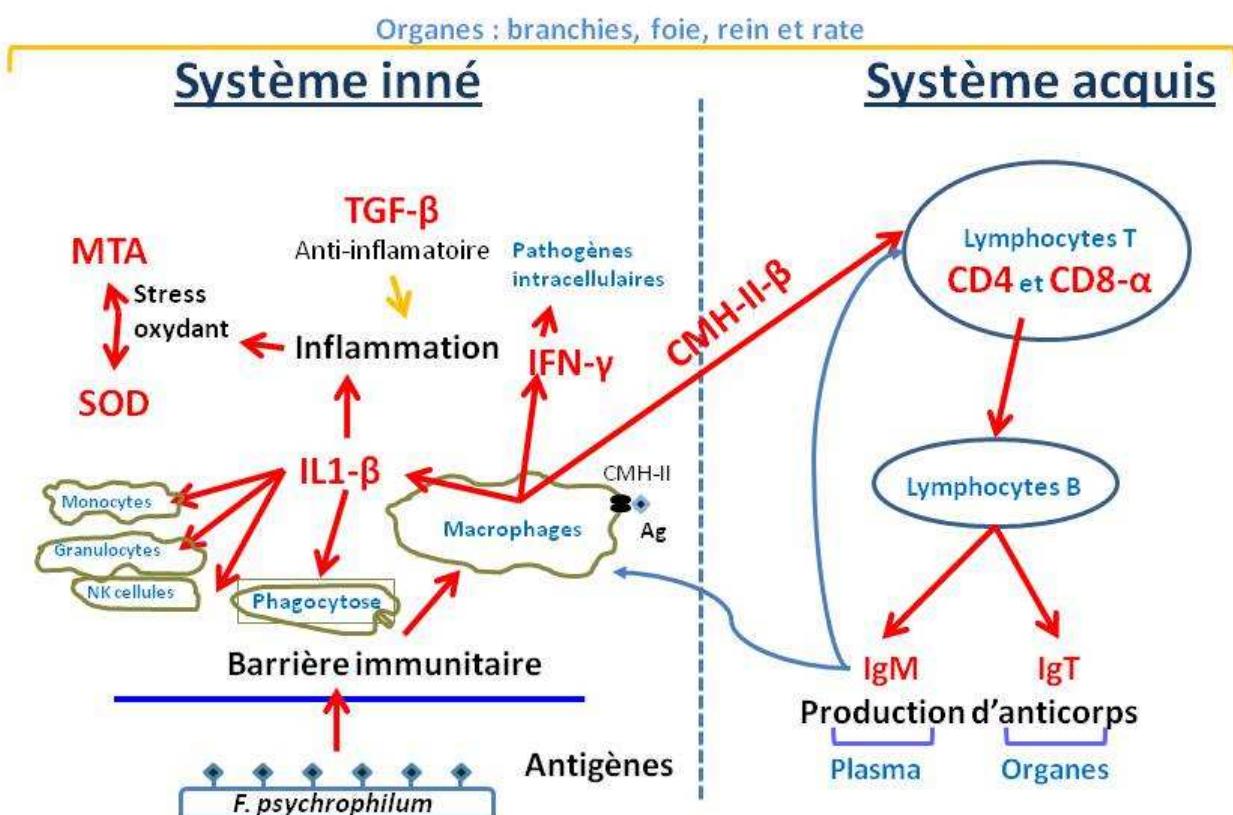
## 4.4. Etude de terrain de la relation hôte-pathogène

### 4.4.1. Introduction

Etant donné les difficultés rencontrées pour reproduire la maladie en laboratoire, il a été décidé de s'orienter vers le terrain où la pathologie se manifeste réellement. Cependant, les piscicultures sont plus ou moins affectées par la flavobactériose. Si la baisse de température de l'eau au début de l'hiver semble déclencher la maladie chez des poissons porteurs, cela n'est pas toujours le cas. En effet, il existe des piscicultures qui ne présentent pas d'épisodes infectieux à *F. psychrophilum* au cours des périodes hivernales alors que des poissons y ont été détectés positifs à la flavobactériose. A l'évidence, des facteurs environnementaux autres que la température sont impliqués dans le déclenchement de la maladie. Aussi, nous avons réalisé une étude en partenariat avec 7 piscicultures d'Aquitaine au cours de l'hiver 2009-2010 afin d'établir un lien éventuel entre le déclenchement de la flavobactériose et 1/ la charge initiale en bactéries chez les poissons, 2/ l'état de stress et de santé des poissons, et 3/ le contenu métallique de l'eau rendant compte de sa qualité. En effet, certains métaux comme le fer, le cuivre ou le zinc sont connus pour influencer la pathogénicité des bactéries.

Ces 7 piscicultures d'Aquitaine ont été choisies parce qu'elles représentent trois cas différents. Certaines présentent annuellement, de manière récurrente, des flavobactérioses sur poissons juvéniles et alevins (plusieurs fois par an), d'autres ne déplorent qu'occasionnellement la maladie (une fois par an), alors que pour quelques fermes, les épisodes infectieux sont extrêmement rares (une fois tous les 5 ans). Dans un souci de simplification et également pour faciliter par la suite l'anonymat des structures, une lettre-code a été attribuée à chacune des piscicultures. Tous les sites sont plus ou moins interconnectés dans un réseau technico-économique notamment par l'intermédiaire de la vente d'œufs ou d'alevins (**Fig. 18**). Toutes les piscicultures-partenaires ont connu au moins, une fois au cours des cinq dernières années, un cas de flavobactériose. Le site C est le plus infecté dans la mesure où chaque arrivage d'alevins déclenche un épisode infectieux. De la même manière, des cas de flavobactérioses sont fréquents sur le site D, plus particulièrement avec les alevins issus de l'écloserie propre au site. En janvier 2010, aucun poisson ne présentait de signes cliniques de la maladie sur le site G alors qu'elle est apparue en juin avec une eau dont la température était voisine de 14 °C. Sur le site F localisé en montagne (eau de grande qualité physicochimique), les épisodes infectieux sont rares tant chez les animaux évoluant dans les bassins alimentés avec de l'eau d'un torrent que ceux baignant dans une eau

# Système immunitaire



**Fig. 6.** Schéma du système immunitaire de la truite arc-en-ciel connu et des biomarqueurs retenus pour cette étude. Au gauche, figurent les acteurs du système immunitaire inné et à droite ceux du système immunitaire acquis. Les protéines marqueurs que nous avons sélectionnés sont en rouges, nous en testerons l'expression des gènes correspondants. Il s'agit d'un marqueur de l'inflammation : l'interleukine 1-  $\beta$  (IL1- $\beta$ ) ; de deux marqueurs du stress oxydant : une métallothionéine (MTA) et la superoxyde dismutase (SOD) ; d'une cytokine anti-inflammatoire, le facteur de croissance transformant  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ; d'un marqueur de pathogène intracellulaire, l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ; du complexe majeur d'histocompatibilité de type 2 (CMH-II) ; de deux marqueurs de l'activation et de la différenciation des lymphocytes T, les cluster de différenciation 4 et 8 (CD4 et CD8- $\alpha$ ) ; des immunoglobulines de type M et T (IgM et IgT). Les flèches rouges représentent les voies d'activation testées, les flèches bleues, les liens entre systèmes acquis et inné.

#### 4. Approche écotoxicologique de la relation hôte-pathogène

de forage. La flavobactériose est très occasionnelle sur les sites A et E, en fonction des arrivages et des lots d'alevins. Enfin, le site B, qui correspond à la plus grosse écloserie de la région, produit l'essentiel des œufs qui sont distribués dans les piscicultures citées précédemment. Dans ce site, la flavobactériose a posé beaucoup de problèmes par le passé ; il semble que l'antibiothérapie, combinée avec des mesures prophylactiques sanitaires sévères, ait réduit le nombre d'épisodes infectieux.

Pour cette étude, 61 poissons ont été prélevés dans les 7 sites. Lors de cette phase de prélèvement, nous avons voulu un échantillonnage le plus représentatif possible de tous les cas pouvant être rencontrés par un pisciculteur : des poissons apparemment sains, des poissons malades de la forme interne et/ou externe du RTFS, des poissons d'un poids allant de 2 à 100 g et évoluant dans une eau de température allant de 8 à 14 °C, des individus ayant été traités préalablement, ou pas, avec un antibiotique (florfénicol).

En terme analytique, nous avons fait des prélèvements d'eau sur chaque site afin d'y doser la flavobactérie et les métaux essentiels comme le zinc, le fer et l'aluminium puis les métaux traces comme le cadmium, le plomb et l'arsenic ; car ces derniers peuvent perturber le système immunitaire des poissons ou induire la pathogénicité de la bactérie (Bols *et al.* 2001). Sur les poissons, nous avons réalisé la quantification de la bactérie en utilisant la technique de qPCR sur la peau, le muscle, les branchies, le foie, le rein et la rate. Cette détection nous a permis d'étudier la présence d'une éventuelle corrélation entre la maladie et le titre bactérien chez les poissons. Ensuite, l'activité du système immunitaire de chaque poisson a été évaluée grâce à la mesure de l'expression de gène de l'immunité et de réponse au stress et au dosage des anticorps circulant (IgM) par dosage immunoenzymatique. Il s'agit d'évaluer une éventuelle corrélation entre la présence de la bactérie et la réponse immunitaire de l'hôte. Les gènes sélectionnés témoignent de l'activité du système immunitaire inné (*il1-β*, *ifn-γ*, *tgf-β*, *cmh2-β*), du système immunitaire acquis (*cd4*, *cd8-α*, *igm*, *igt*), et du stress oxydant généré par la réponse immunitaire (*mta* et *sod*) (**Fig. 6**, rapport de la page 15).

##### 4.4.2. Résultats et discussion

Cette première étude confirme la grande dissémination de *F. psychrophilum* dans les piscicultures, à la fois au niveau des poissons malades et apparemment sains. A l'aide de la qPCR (cf chap 3.), nous avons quantifié la flavobactérie dans tous les sites testés (7 piscicultures), avec des charges microbiennes assez variables. Toutefois, les poissons testés

TABLEAU 21. Expression différentielle des gènes dans les organes des poissons malades comparés à ceux des poissons apparemment sains (moyenne  $\pm$  SEM)<sup>a</sup>

Gène réponse aux stress	Fonction	Branchies	Foie	Rate	Rein
<i>mt-a</i>	metallothioneine isoforme 1	+5,0*	+4,0*	+4,0*	+2,5*
<i>sod1</i>	Cu/Zn superoxyde dismutase				
<u>Cytokines</u>					
<i>il-1β</i>	interleukine 1, chaîne β	+7,3*	+20,4*	+4,9*	+18,8*
<i>ifn-γ</i>	interféron γ				
<i>tgf-β</i>	Facteur de croissance transformant β			-4,4*	
<u>Récepteurs cellulaires</u>					
<i>cd8-α</i>	cluster de différenciation 8, chaîne α porté par les lymphocytes B			-4,5*	
<i>cd4</i>	cluster de différenciation 4 porté par les lymphocytes B				
<i>mhc2-β</i>	complexe majeur d'histocompatibilité type 2, chaîne β porté par les macrophages			-3,8*	+2,3*
<u>Immunoglobulines</u>					
<i>igm</i>	immunoglobuline M-like		+8,2*		
<i>igt</i>	immunoglobuline T			-3,1*	

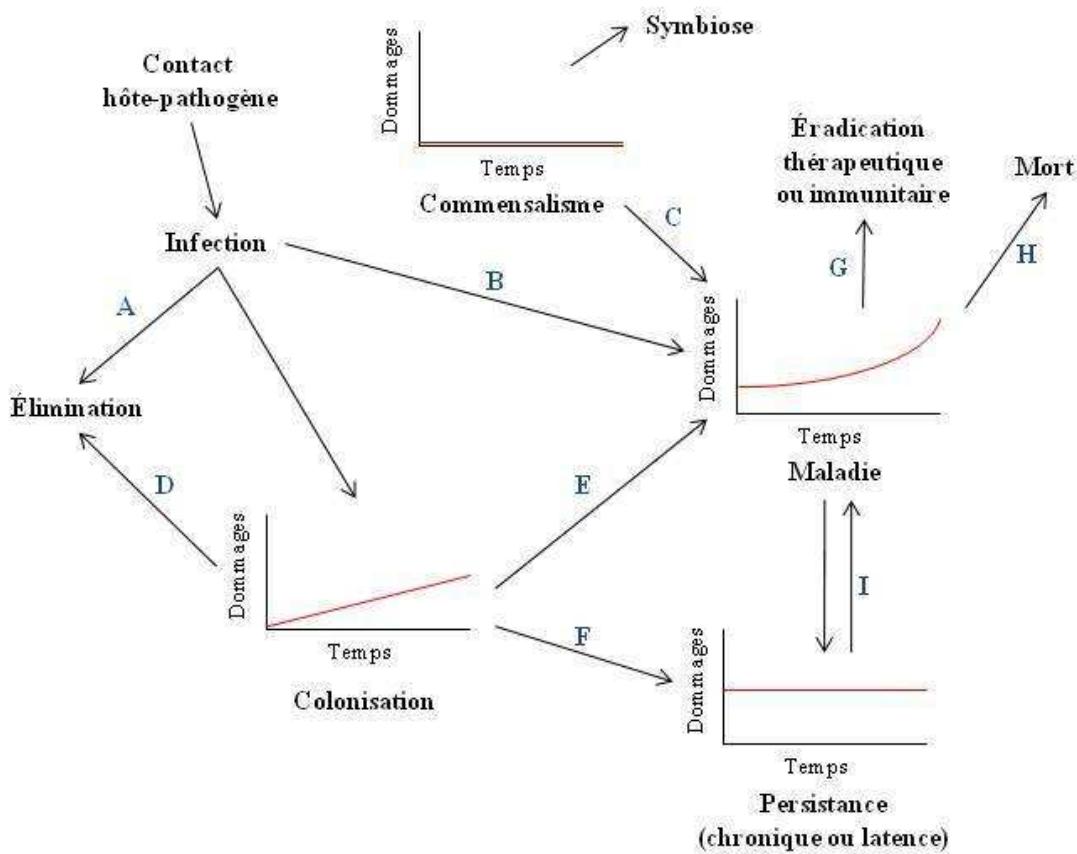
<sup>a</sup> Seules les différences statistiquement significatives apparaissent; +: gène surrexprimé; -: gène réprimé

\*:  $p$ -value < 0,05

#### 4. Approche écotoxicologique de la relation hôte-pathogène

positifs à la flavobactéries ne présentaient pas tous les signes cliniques de la flavobactériose (ulcères, nécroses, anémies, inflammations de la rate, ...). Un grand nombre d'entre eux avaient été traités par aliments supplémentés avec un antibiotique (florfénicol). A l'évidence, les poissons traités restent porteurs de la flavobactéries malgré les traitements antibiotiques. Ils constituent donc des réservoirs permettant la persistance, les disséminations futures du pathogène et les épisodes "erratiques" de la maladie en conjonction avec d'autres facteurs : la fragilité de l'hôte ; la virulence du pathogène ; la dégradation ou la modification du milieu ; la qualité de la conduite de l'élevage... Les charges en flavobactéries les plus importantes ont été mesurées dans le rein et la rate chez les animaux atteints par la forme interne de la maladie. Ces deux organes assurent des fonctions physiologiques clefs pour le poisson dans l'épuration sanguine et dans la maturation des cellules du système immunitaire. Les différences de virulence entre la forme interne et externe ne sont pas connues. Il pourrait s'agir de souches de *F. psychrophilum* différentes qui s'installent dans tels ou tels organes ou de souches identiques mais qui expriment des facteurs de virulence distincts en fonction de paramètres à identifier. Par ailleurs, nous avons pu constater que les œufs produits sur le site B sont dépourvus de pathogène. Cela dit, ces mêmes œufs et alevins, diagnostiqués initialement non porteurs de la bactéries, le deviennent par contamination horizontale au cours de leur croissance en raison de l'omniprésence de *F. psychrophilum* sur les sites d'élevage. Ces observations soulignent l'importance des mesures d'hygiène et de désinfection qui devraient être mises en place de manière systématique pour limiter les contaminations à chaque rotation des lots de poissons. Il reste à définir ces mesures et vérifier leur efficacité afin d'en rendre compte à la profession à travers ce qui pourrait être un « manuel des bonnes pratiques ». A la lumière de ce travail, aucune corrélation n'a été observée entre la dose de métaux détectée dans l'eau et l'occurrence de la maladie.

L'expression génique mesurée sur les poissons malades ou apparemment sains (**Tableau 21**) nous apporte deux informations importantes. Tout d'abord, les gènes *mta* et *ill- $\beta$* , qui sont surexprimés dans les branchies, le foie, le rein et la rate des poissons malades, sont de bons biomarqueurs de la maladie. La synthèse des métallothionéines est en effet induite par le stress oxydant généré par l'inflammation (Inoue *et al.* 2009) et l'interleukine 1  $\beta$ , la cytokine messagère de l'inflammation (Delaleu and Bickel 2004). Ensuite, la répression des gènes *mhc2- $\beta$* , *tgf- $\beta$* , *cd8- $\alpha$*  et *igt* dans la rate des poissons malades montre un effondrement du système immunitaire acquis pouvant permettre l'apparition de la maladie. De plus, les plus forts titres en anticorps ont été détectés dans le sang des poissons apparemment sains.



**Fig. 7.** Issue et modalités de la relation hôte-pathogène en fonction des dommages causés dans le temps proposé par Casadevall et Pirofski. La quantité des dommages peut être variable selon le cas étudié. A : l'acquisition d'un pathogène peut être suivie par son élimination aux barrières défensives ou aux défenses immunitaires. B : l'acquisition d'un pathogène provoque directement des dommages et une maladie. C : certains microbes commensaux peuvent causer une maladie si l'état de commensalisme est perturbé par une diminution du système immunitaire ou une perturbation de la flore microbienne de l'hôte. D : l'état de colonisation peut être terminé par l'activation d'une réponse immunitaire à partir d'un certain seuil de dommages. E : L'état de colonisation peu aboutir à la maladie après un seuil de dommages atteint. F : l'état de colonisation peut aboutir à un état de persistance où le système immunitaire est incapable d'éradiquer l'infection et les dommages persistent de façon continue. G : une réponse immunitaire ou une thérapie peuvent éradiquer l'infection mais pas nécessairement la maladie car l'infection a peu causer des dommages irréversibles. H : si la relation hôte-pathogène a causé suffisamment de dommages, la mort s'ensuit. I : la persistance de l'infection peut causer à long terme l'apparition ou réapparition de la maladie.

#### 4. Approche écotoxicologique de la relation hôte-pathogène

En résumé, ce travail démontre que la flavobactérie est omniprésente et que sa pathogénicité est endiguée par le système immunitaire des poissons apparemment sains. L'apparition des signes cliniques de la maladie chez certains individus serait liée à la contamination par les bactéries de la rate et du rein provoquant une faille dans le système immunitaire. En reprenant le modèle de relation hôte-pathogène présenté en introduction (**Fig. 7**, rapport de la page 16), nous pouvons émettre deux hypothèses quant à la relation *Oncorhynchus mykiss-Flavobacterium psychrophilum*. Soit la bactérie ce comporte comme une commensale de la truite et profite d'une faiblesse passagère de sa santé immunitaire (**Fig. 7C**), soit elle est en état de latence maîtrisée et use les défenses immunitaires qui finissent par céder chez les individus les plus faibles (**Fig. 7I**). Pour confirmer ces hypothèses, il faudrait mesurer les dommages causés par la bactérie sur les poissons sains, c'est-à-dire disposer de poissons témoins dépourvus de toute flavobactérie ; ce qui semble difficile en raison de l'omniprésence de *F. psychrophilum* dans les fermes aquacoles. Quoi qu'il en soit, la bactérie provoque nécessairement des dommages chez les poissons apparemment sains en raison 1/ de son importance quantitative dans certains organes ( $10^8$  bactéries/g de tissu) et 2/ du fait qu'elles ont trouvé un milieu nutritionnellement favorable à une telle croissance et qu'elles provoquent nécessairement une ponction des nutriments dans les organes infectés.



**Prevalence of *Flavobacterium psychrophilum* bacterial cells in farmed rainbow trout: characterization of metallothionein A and interleukine1- $\beta$  genes as biomarkers overexpressed in spleen and kidney of diseased fish.**

**Nicolas Orieux<sup>1</sup>, Michel Le Hénaff<sup>1</sup>, Diane-Gaëlle Douet<sup>2</sup> and Jean-Paul Bourdineaud<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Université de Bordeaux, CNRS UMR ‘Environnements et Paléoenvironnements Océaniques’, station marine d’Arcachon, Place du Dr. Peyneau, F-33120 Arcachon Cedex, France.

<sup>2</sup> Groupement de Défense Sanitaire Aquacole d’Aquitaine, 1 rue Marcel David - BP 219, F-40004 Mont de Marsan Cedex, France.

**Running title:** *Flavobacterium psychrophilum* titration in farmed trout

**\*Corresponding author:** J.-P. Bourdineaud, Université de Bordeaux, CNRS UMR 5805 EPOC, station marine d’Arcachon, Place du Dr. Peyneau, Arcachon, F-33120, France (tel : 00 33 5 56 22 39 26, fax: 00 33 5 56 54 93 83, e-mail: [jp.bourdineaud@epoc.u-bordeaux1.fr](mailto:jp.bourdineaud@epoc.u-bordeaux1.fr))

**Section:** environmental microbiology

Article en cours de rédaction



**Abstract**

A total of 61 fish were sampled from seven fish farms in Aquitania region (France), and could be distributed in two groups: 1/ diseased fish suffering from the rainbow trout fry syndrome caused by the bacteria *Flavobacterium psychrophilum* as detected by visual diagnostic and 2/ apparently healthy fish. Flavobacteria were titered by qPCR targeting a specific area of the 16S rRNA gene in skin, muscle, gills, liver, spleen and kidney from all fish. The pathogen was detected in all of these organs whatever the health status with titers ranging from  $10^4$  to  $6 \times 10^7$  for apparently healthy fish, showing they were bacterial carriers. Two organs permitted to distinguish diseased and apparently healthy fish: spleen and kidney with titers ranging from  $10^6$  to  $10^7$  for apparently healthy fish against  $10^{11}$  to  $10^{12}$  for diseased fish. No relationship was found between the immunoglobulin M-like titer in fish plasma and the health status, and the highest IgM levels were even found in apparently healthy fish. The gene expression analysis in fish organs revealed that two genes were found to be good biomarkers of the flavobacteriosis: the metallothionein A and the interleukine1- $\beta$  genes which were both over-expressed in gills, liver, spleen and kidney of diseased fish. Moreover, 4 immunity genes were down-regulated in spleen (a key organ implicated in immunity) of diseased fish: transforming growth factor  $\beta$  (*tgf- $\beta$* ), cluster of differentiation 8  $\alpha$  (*cd8- $\alpha$* ), major histocompatibility complex II  $\beta$  chain (*mhc2- $\beta$* ) and immunoglobulin T genes (*igt*), suggesting a collapse of the immune system.



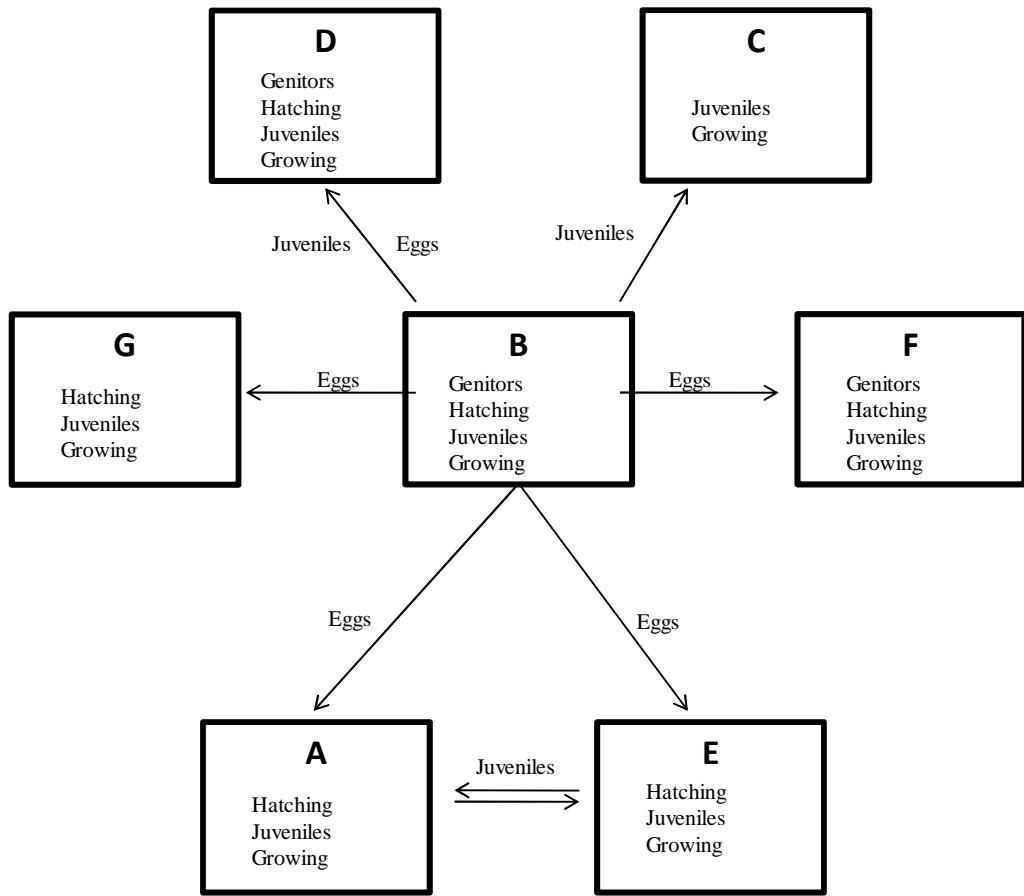
## Introduction

The bacteria *Flavobacterium psychrophilum* is the causative agent of bacterial cold water disease (BCWD) and rainbow trout fry syndrome (RTFS) in many salmonid fish (Holt 1987). Outbreaks of the disease, which may lead to 50 % of mortality, occur typically in water at temperature below 14 °C. No vaccine is available and control of the outbreaks currently involves antibiotic drug administration. Flavobacteriosis have important economic consequences because of the large and growing aquaculture industry worldwide. For instance, in France the Aquitania region is specialized in trout farming, and in 2004 flavobacteriosis outbreaks resulted in an estimated 10 millions € of economical loss (Guichard 2004). The visual diagnostic of the disease can distinguish two modalities: external necrosis of tissues (skin and muscles in the caudal region) and big belly-afflicted fish. Up to now, there are no clues to understand and predict which of the two modalities could strike fish after infection and the nature of the mechanisms leading to disease onset, if ever. In fact, it is not known which tissue is the entry gate for the pathogen. In previous studies, salmon and ayu were infected with *F. psychrophilum* by balneation, and the pathogen was detected in the mucus, skin and jaws of the animals by electron microscopy (Kondo *et al.* 2002; Martinez *et al.* 2004). However, the bacterial titers used, up to  $7.9 \times 10^8$  bacteria per ml, is extremely high and not relevant from an environmental point of view. The adhesion of bacteria to external tissues of fish doesn't answer to the question about the entry gate, and cannot explain the inflated belly form of the disease. Moreover, virulence factors of the bacteria are not yet elucidated even if few hypotheses have been made previously such as its ability to produce exotoxines or endotoxines and to express extracellular proteases (Secades *et al.* 2001, 2003) or to regulate the iron uptake mediated by siderophores (Alvarez *et al.* 2008). Until now, the pathogen-host relationship has been addressed with laboratory-infected fish. A previous study had already detected the flavobacteria in diseased and apparently healthy aquacultured fish (Madetoja *et al.* 2002) but nothing is known about quantitative prevalence of the bacteria. In the present study, we sampled apparently healthy and diseased fish from various fish farms in the Aquitania region, and quantified the *F. psychrophilum* bacterial titters in various tissues, to see whether a correlation could exist between the disease and the tissue bacterial load. In order to precise the vertical spread of the disease, we also quantified flavobacteria in coelomic fluids and eggs. It has been shown that flavobacteria remain stuck to trout eggs after balneation contact (Vatsos *et al.* 2006). But in our hands, we wanted to know whether female genitors delivered eggs devoid or already carriers of the bacteria.



#### *4. Approche écotoxicologique de la relation hôte-pathogène*

Metal contamination can lead to fish immunity perturbation or modulation (Bols *et al.* 2001), and therefore to a decrease of fish resistance against a subsequent pathogen. That is why we performed an exhaustive metal overview in the fish farms' water in order to detect any differences that could be correlated with prevalence of the bacteria and occurrence of the disease. Another point which deserves attention is the antibody titer in fish plasma, and that is why we quantified IgM plasma in aquacultured fish. Are diseased fish presenting a higher plasma IgM titer than apparently healthy fish? Up to know, IgM titer were determined in vaccinated fish plasma only, and results showed that this titer much increased after vaccination trial (Rahman *et al.* 2002; Kondo *et al.* 2003; LaFrentz *et al.* 2004; Dumetz *et al.* 2006). The last question we wanted to address was the possibility to identify biomarker genes associated to flavobacterial disease. Indeed, fish exhibit a gene expression response against bacterial pathogens including the differential expression of genes involved in immune functions such as *il-1 $\beta$* , *tgf- $\beta$* , *cd4*, *cd8- $\alpha$* , *mhc2- $\beta$*  (Lindenstrøm *et al.* 2004; Komatsu *et al.* 2009; Raida and Buchmann 2009) and the metallothionein genes which have been shown to intervene in inflammatory process (Inoue *et al.* 2009) and to be up-regulated after infection by *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease in rainbow trout (Baerwald *et al.* 2008), and up-regulated after infection of cod with *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida* (Caipang *et al.* 2010). In the present study we have analyzed the expression level of the above cited genes involved in the stress response and the immune function.



**FIG. 1.** Network of fish farms in Aquitania region (France). 7 fish farms are anonymously indicated by bold letters. They are linked through trading activity and fish exchange habits. Eggs and juveniles selling and exchanges between fish farms are indicated. For each farm, the type of activity and stage of fish growth are mentioned.

## Materials and methods

### Fish sampling

Seven rainbow trout farming sites of Aquitaine were chosen because they present occasionally or rarely or in a recurring way flavobacteriosis on young fish and fry. In order to simplify process and to insure structure anonymity, a letter-code was attributed to each site. All sites are linked by eggs, fry and juveniles trade or exchange in a partnership network (fig 1).

In each site (table 4), about 3 to 10 apparently healthy (H) and diseased (D) fish, if any, were sampled according to a visual diagnosis with the help of a professional veterinary in January 2010. Eggs were sampled in indoor hatchery basins, fry in indoor rearing basins, and juveniles in outdoor growth rearing reservoirs. Blood was sampled from non-anaemic fish and fish of weight superior to 1 g, with a heparinised syringe and needle through the caudal vein. In the reproduction fish farm (site B) coelomic fluids were aseptically sampled from female genitors during the spawning step, just after the eggs recovery, and stored at - 20 °C before use. Routinely, eggs are immediately submitted to an antiseptic treatment after spawning. Ten eggs from site B were harvested from a hatchery tank several days after spawning.

Apparently healthy fish featuring good appetite and swimming behavior were sampled. The visual diagnostic can distinguish two forms of illness: an external and an internal. Fish suffering from the external form of flavobacteriosis were distinguished by skins and muscle necrosis, and those struck by the internal form were recognized by their lack of appetite and a typical big belly. In case of onset of another flavobacteriosis episode occurring in winter and spring 2010, another sampling was performed (in March 2010 in site C and in June 2010 in site G). In sites A, E and G fish could be treated with antibiotics (florfenicol) through diet for 2 days when diseased animals appeared in the reservoir.

### Bacterial titration in water

Water samples (500 mL) were aseptically filtered (FTA-concentrator PS, Whatman) according to the manufacturer's instructions. 1.44 cm<sup>2</sup> of a 9.08 cm<sup>2</sup>filter was cut with a sterile scalpel and eluted in 1 mL of 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4 (TE buffer) and stored at - 20°C until use.



#### 4. Approche écotoxicologique de la relation hôte-pathogène

##### Metal titration in water samples

For As, Zn, Cd and Pb analysis, water samples were filtered and acidified with 10 % nitric acid. As, Cd and Pb determinations were performed with an atomic absorption spectrophotometer (M6 Solaar AA, Thermo Elemental) equipped with a graphite tube atomizer (GF95 Graphite Furnace). To avoid interference, the appropriate diluted solutions were analyzed in a tube atomizer with a mixture of the appropriate matrix modifier. The detection limit was 0.01 µg Cd / L, 0.05 µg As / L and 0.01 µg Pb / L. Zinc concentrations were determined by flame atomic absorption spectrophotometry (Varian AA220FS). The detection limit was 1 µg Zn / L. Al, Ag and Se analysis were performed by ICP-MS according to the ISO 17294-2 standard procedure. Sn and Fe analysis were performed by ICP-AES according to the ISO 11885 standard procedure.

##### Total DNA extraction

Fish tissue samples for *F. psychrophilum* detection and quantification (skin, muscle, gills, liver, spleen and kidney) were aseptically dissected and conserved at -20°C. Total DNA were extracted from a maximum of 40 mg tissue using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Total DNA was eluted in 200 µL TE buffer and stored at - 20°C until real time PCR procedure.

##### Total RNA extraction and cDNA synthesis

Fish tissue samples for gene expression analysis (gills, liver, spleen and kidney) were quickly dissected and conserved in RNA later (Qiagen) at - 80 °C. Total RNAs were extracted from a maximum of 40 mg tissue using the Absolutely RNA Miniprep kit (Agilent), according to the manufacturer's instructions. The quality of all RNAs produced was evaluated by electrophoresis on a 1% agarose gel. First-strand cDNA was synthesized from 11.7 µL total RNA using the AffinityScript Multiple Temperature RT (Agilent). RNA was adjusted to 15.7 µL with RNase-free water after the addition of 1 µL of 0.5 µg / µL oligo(dT) and 3 µL of 0.1 µg / µL random nonamer primers. RNA mixture was then incubated at 65 °C for 5 min and at room temperature for 10 min. Next, 0.5 µL of 40 U / µL RNase Block Ribonuclease Inhibitor, 0.8 µl of 25 mM each dNTPs mix, 2 µL of 10x AffinityScript RT buffer and 1 µL of AffinityScript Multiple Temperature retrotranscriptase were added. The reaction was

TABLE 1. Q-PCR expression of relevant genes in rainbow trout

Gene	Accession number	Nucleotide sequence (5' to 3')	Amplicon size
<u>Housekeeping gene</u>			
<i>act-β</i>	AJ438158	TGGGGCAGTATGGCTTGTATG CTCTGGCACCTAATCACCTCT	165
<u>Stress response gene</u>			
<i>mt-a</i>	M18103	CATTCGGATAAAGAAGGTAGC GTGATGTCATACACAGGC	240
<i>sod1</i>	AF469663	CTGCTTGAAGACCACT CCATTGAGGCCACGACTA	240
<u>Cytokines</u>			
<i>il-1β</i>	AJ004821	CGTCCCCATTGAGACT GTTTGCAGGCCATCTTAG	350
<i>ifn-γ</i>	AY795563	AAGGGCTGTGATGTGTTCTG TGTACTGAGCGGCATTACCTCC	68
<i>tgf-β</i>	X99303	TCTGAATGAGTGGCTGCAAG GGTTTCCCACAATACAAGG	75
<u>Cell receptor</u>			
<i>cd8-α</i>	AF178054	ACACCAATGACCACAACCATAAGAG GGGTCCACCTTCCCACCTT	74
<i>cd4</i>	AY973028	CATTAGCCTGGGTGGTCAAT CCCTTTCTTGACAGGGAGA	89
<i>mhc2-β</i>	AF115533	TGCCATGCTGATGTGCAG GTCCCTCAGCCAGGTCACT	67
<u>Immunoglobulin</u>			
<i>igm</i>	S63348	CTTGGCTTGTGACGATGAG GGCTAGTGGTGTGAATTGG	72
<i>igt</i>	AY870265	AGCACCAAGGGTGAAACCA GCGGTGGGTTTCAGAGTCA	72

TABLE 2. Mean ± SEM of *act-β* gene Ct in apparently healthy and diseased fish organs

Gills		Liver		Spleen		Kidney	
Healthy	Diseased	Healthy	Diseased	Healthy	Diseased	Healthy	Diseased
22.4 ± 0.6	22.5 ± 0.6	22.5 ± 0.6	22.4 ± 0.6	22.3 ± 0.6	21.8 ± 0.8	22.5 ± 0.6	21.6 ± 0.6

#### 4. Approche écotoxicologique de la relation hôte-pathogène

incubated for 20 min at 42 °C and 40 min at 54 °C in an Eppendorf Mastercycler. The cDNA mixture was conserved at - 20°C until it was used in a real-time PCR reaction.

##### F. psychrophilum quantification by qPCR

For bacterial detection and quantification, each real time PCR reaction was made up in 25 µL consisting of 12.5 µL of Brilliant Blue Syber Green Q-PCR master mix (Agilent), 2 µL of primer mix at 10 µM each, 5 µL of 10-fold diluted target sample, 5.5 µL of nuclease free water in a 96 well microplate. An Agilent MX3000p thermocycler was programmed as follows: 10 minutes at 96 °C, then 40 cycles of 30 seconds at 96 °C, 30 seconds at 56 °C, 30 seconds at 72 °C followed by an increasing temperature ramp to determine amplicons melting temperatures. The *F. psychrophilum* specific primers were Fp\_16S1\_fw (5'-GAGTTGGCATCAACACAC-3') and Fp\_16Sint1\_rev (5'-TCCGTGTCTCAGTACCAAG-3'). A standard curve was realized with a fragment of *F. psychrophilum* 16S rRNA gene cloned into a vector plasmid (Orieux *et al.* 2011). This fragment is precisely the amplicon produced by PCR using the two *F. psychrophilum* specific primers describe above. Since *F. psychrophilum* harbors 6 copies of 16S rRNA gene in its genome, the 16S rRNA copy number obtained from the calibration curve is divided by 6 to yield the bacteria number. The bacterial titer is then calculated by dividing the bacteria number by the tissue weight, taking into account the dilution factor. The quantification limit (QL) has been determined: 10 16S rRNA gene copies / PCR well, making 1.7 bacteria / PCR well. Being given the dilution factors, QL is equal to 680 bacteria/sample. Samples for which the quantification limit is reached can be divided in two cases: those presenting a melting temperature peak corresponding to the 16S rRNA gene target, displayed by the melting temperature curve, and those lacking such a peak. They appear in Table 4 under the abbreviation < QL for the former and ND for the latter.

##### Gene expression analysis

For gene expression analysis the accession numbers of the 11 genes used in our study are reported in Table 1. We have chosen 8 genes involved in the immune function, 3 of them being cytokine genes, 3 others encoding cell receptors harbored by antigen-presenting cells and 2 encoding heavy chain of immunoglobulin M and T. Two stress responsive genes were also selected, namely metallothionein A and Cu/Zn cytoplasmic superoxide dismutase, because the immune response to bacterial pathogen is likely to generate reactive oxygen



#### 4. Approche écotoxicologique de la relation hôte-pathogène

species. The real time PCR reactions were made in 25 µL made up with 12.5 µL of Brilliant Blue Syber Green Q-PCR master mix (Agilent), 2 µL of primer mix at 2 µM each, 2 µL of cDNA mixture 2-fold diluted, and 8.5 µL of nuclease free water in a 96 wells microplate. An Agilent MX3000p thermocycler was programmed as follows: 10 minutes at 96°C, then 50 cycles of 30 seconds at 96°C, 30 seconds at 54°C, 30 seconds at 72°C followed by an increasing temperature ramp from 65 to 95 °C to determine amplicons melting temperature. The selected reference gene was that of β-actin (*act-β*). The choice of this reference gene proved to be accurate since the means of Ct related to this gene did not vary between apparently healthy and diseased fish samples whatever tissue considered (Table 2). The relative gene expression of a gene is its level of expression divided by that of the reference gene and is calculated by  $2^{-\Delta Ct}$ , where  $\Delta Ct$  is equal to gene Ct minus *act-β* gene Ct. The differential expression of a gene is the ratio of the relative gene expression in diseased fish over that in apparently healthy fish.

#### Anti Fp IgM titration

Serum was separated from blood cells with a 500 x g centrifugation step for 10 minutes. 96 wells flat bottom polyvinyl plates (Greiner) were coated with external envelop fraction of *F. psychrophilum* prepared as described before (Dumetz *et al.* 2008) at 10 µg of protein/ml in carbonate buffer (0.1 M, pH 9.6, 100 µL / well), incubated at 4°C overnight and washed three times with phosphate buffer saline (PBS; 0.01 M, pH 7.2) containing 0.05 % Tween 20 (PBS-T). Serum was serially diluted 2-times with PBS-T from dilution factor 1/50 to 1/51 200. 100 µL of each dilution was added in microplate wells and incubated overnight at 15°C. The plates were washed three times with PBS-T. 100 µL / well of 1/2000 rabbit anti-rainbow trout IgM-like IgG (INRA Rennes) was added and incubated 3 hour at 37°C, followed by 3 washes with PBS-T. 100 µL / well of 1/2000 goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-conjugated IgG and incubated 1 hour at room temperature, followed by 3 washes with PBS-T. To measure peroxidise activity, 100 µL / well of substrate solution containing 5 mM O-phenylene-diamine dihydrochloride (10 mg in 20 mL) and 0.025 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 µL of 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 20 mL) in 0.15 M citrate-phosphate buffer (pH 5.0), are added. Reactions took place at room temperature for 30 minutes and stopped with 50 µL / well of 4M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. ODs were read at 490 nm. Comparative titre (UIg) was estimated by multiplying dilution factor with the respective OD comprised between 0.1 and 0.5.

TABLE 3. Metal titration in site water (given in µg/L)

Metal	Method	Drinkability standard UE (µg/L)	Site and water source							
			A		B		C		D	
			River	River	River	River	River	River	River	
Al	ICP-MS	200	73	NR	140	NR	85	120	2	13
Ag	ICP-MS	10	< 0.5	NR	< 2	NR	< 2	< 2	< 0.5	< 0.5
As	AA furnace	10	0.6199	0.4283	0.2494	0.3964	0.816	0.1138	0.3438	0.0775
Sn	ICP-AES		< 1	NR	< 10	NR	< 10	< 10	< 1	< 1
Fe	ICP-AES	200	160	NR	380	NR	460	140	1	220
Se	ICP-MS	10	< 0.1	NR	< 10	NR	< 10	< 10	< 0.5	< 0.1
Zn	AA flame	5000	21.42	12.35	17.034	8.22	7.14	13.158	9.792	10.404
Cd	AA furnace	5	0.0339	0.0193	0.0186	0.0287	0.0546	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Pb	AA furnace	10	0.8424	0.5644	0.5966	0.4682	0.5585	0.4168	< 0.01	0.3818

NR : analysis non realized.

#### *4. Approche écotoxicologique de la relation hôte-pathogène*

##### Statistical analysis

Significant differences in gene expression levels between diseased and apparently healthy fish organs were determined using the non-parametric Mann & Whitney U-test.

## Results

##### Sites contamination context

All the fish farming sites have known at least one flavobacteriosis episode during the last five years. The site C is the most infected since every fry batch starts an infectious episode. Likely, cases of flavobacteriosis are frequent in site D, more particularly with fry from the hatching bath. In January 2010, no fish presented clinical signs of the disease in site G while it appeared in June with a water temperature around 14 °C. In site F located in the Pyrénées mountains, and supplied with high quality water, coming either from drilled well or from a torrent, the infectious episodes are rare. The disease is occasional in sites A and E and depends on fry provenance. Finally, the site B which corresponds to the biggest hatching site of the Aquitania region produces the main part of eggs which are distributed in fish farms quoted previously. The disease is contained on this site thanks to antibiotic treatments combined with effective sanitary preventive measures.

##### Metal titration in site water

Metal analysis were performed in waters feeding the fish farms. Nine metals have been titered in water samples from each fish farm (Table 3): aluminum (Al), silver (Ag), arsenic (As), tin (Sn), iron (Fe), selenium (Se), zinc (Zn), cadmium (Cd) and lead (Pb). Ag, Sn and Se concentrations are below the limit of detection. Two metals present a great variability of concentrations according to sites: Fe and Al. The sites C and E are supplied with water containing high doses of Fe, 380 and 460 µg/L, respectively, which exceed the drinkability standard equal to 200 µg/L. Sites C and F are supplied with river water containing 140 µg/L of Al above the reference limit. The concentrations obtained for toxic metals (As, Cd and Pb) are much lower than the European standards of drinkability equal to 10, 0.5 and 10 µg/L, respectively. Zn concentrations are in the range found for surface waters in Aquitania, which vary between 5 and 30 µg/L. The drilled well water of site F is poor in metals and especially 2 µg/L of Al and 1 µg/L of Fe.

TABLE 4. Bacterial titer in fish organs and visual diagnostic

Sampling site	Fish	Clinical	Sampling	Fish tank <sup>b</sup>	Weight range	Infection location <sup>c</sup>	Bacterial titer : log <sub>10</sub> (bacteria number/g tissue)					
		diagnostic <sup>a</sup>	period (2010)				Skin	Muscle	Gills	Liver	Spleen	Kidney
A	1	D <sup>d</sup>	January	Rearing tank 1	10 - 20 g	Ext	4.97	< QL	ND	< QL	< QL	< QL
	2	D <sup>d</sup>	January	Rearing tank 1	10 - 20 g	Ext	< QL	5.86	4.17	< QL	< QL	< QL
	3	H <sup>d</sup>	January	Rearing tank 1	10 - 20 g	-	ND	ND	< QL	< QL	< QL	ND
	4	H <sup>d</sup>	January	Rearing tank 1	10 - 20 g	-	< QL	ND	ND	< QL	ND	< QL
	5	H <sup>d</sup>	January	Rearing tank 1	10 - 20 g	-	< QL	ND	< QL	< QL	< QL	< QL
	6	H <sup>d</sup>	January	Rearing tank 1	10 - 20 g	-	< QL	ND	< QL	ND	< QL	< QL
B	1	H	January	Rearing basin 1	1 - 2 g	-					ND <sup>e</sup>	
	2	H	January	Rearing basin 1	1 - 2 g	-					ND <sup>e</sup>	
	3	H	January	Rearing basin 1	1 - 2 g	-					ND <sup>e</sup>	
C	1	H	January	Rearing tank 1	2 - 5 g	-	ND	ND	ND	ND	ND	3.60
	2	H	January	Rearing tank 1	2 - 5 g	-	< QL	3.54	< QL	< QL	< QL	ND
	3	H	January	Rearing tank 1	2 - 5 g	-	ND	< QL	< QL	< QL	ND	ND
	4	D	January	Rearing tank 2	10 - 20 g	Ext	ND	4.06	< QL	< QL	ND	3.80
	5	D	January	Rearing tank 2	10 - 20 g	Ext	5.81	6.88	6.30	1.18	< QL	< QL
	6	D	January	Rearing tank 2	10 - 20 g	Ext	5.46	3.37	2.97	< QL	3.72	< QL
	7	D	January	Rearing tank 2	10 - 20 g	Ext	2.68	4.23	< QL	< QL	< QL	< QL
	8	H	March	Rearing tank 1	5 - 10 g	-	6.67	6.47	4.95	4.93	5.81	4.79
	9	H	March	Rearing tank 1	5 - 10 g	-	6.03	7.50	6.78	7.86	6.37	5.84
	10	H	March	Rearing tank 1	5 - 10 g	-	6.89	5.99	5.08	4.01	7.67	7.38
	11	D	March	Rearing tank 1	5 - 10 g	Ext	< QL	< QL	< QL	< QL	< QL	< DL
	12	D	March	Rearing tank 1	5 - 10 g	Ext	6.31	5.88	6.92	7.54	8.35	6.90
	13	D	March	Rearing tank 1	5 - 10 g	Ext	6.81	5.52	7.67	9.01	8.43	7.02
D	1	D	January	Rearing basin 1	2 - 5 g	Int	< QL	3.29	4.25	3.77	9.54	9.14
	2	D	January	Rearing basin 1	2 - 5 g	Int	< QL	4.60	6.55	< QL	11.48	11.06
	3	D	January	Rearing basin 1	2 - 5 g	Int	< QL	< QL	2.70	2.37	13.59	12.72
	4	D	January	Rearing basin 1	2 - 5 g	Int	5.87	5.13	4.67	5.09	< QL	< QL
	5	D	January	Rearing basin 1	2 - 5 g	Int	4.28	4.13	7.01	4.83	4.44	4.59
	6	D	January	Rearing tank 1	10 - 20 g	Ext	5.03	5.13	6.76	< QL	< QL	5.82
	7	D	January	Rearing tank 1	10 - 20 g	Ext	4.90	< QL	4.08	< QL	5.78	< QL
	8	D	January	Rearing tank 1	10 - 20 g	Ext	4.90	2.99	5.92	< QL	6.07	4.90
	9	D	January	Rearing tank 1	10 - 20 g	Ext	4.69	3.96	3.88	< QL	< QL	4.40

#### 4. Approche écotoxicologique de la relation hôte-pathogène

E	1	D <sup>d</sup>	January	Rearing tank 1	20 - 50 g	Int	< QL				
	2	D <sup>d</sup>	January	Rearing tank 1	20 - 50 g	Int	4.15	3.95	< QL	< QL	< QL
	3	D <sup>d</sup>	January	Rearing tank 1	20 - 50 g	Int	< QL	4.97	< QL	< QL	< QL
	4	H <sup>d</sup>	January	Rearing tank 2	10 - 20 g	-	< QL	4.86	4.56	< QL	< QL
	5	H <sup>d</sup>	January	Rearing tank 2	10 - 20 g	-	4.16	3.29	4.17	3.31	< QL
	6	H <sup>d</sup>	January	Rearing tank 2	10 - 20 g	-	ND	ND	6.63	< QL	ND
	7	H <sup>d</sup>	January	Rearing tank 3	10 - 20 g	-	ND	ND	< QL	< QL	ND
	8	H <sup>d</sup>	January	Rearing tank 3	10 - 20 g	-	ND	ND	< QL	< QL	6.61
	9	H <sup>d</sup>	January	Rearing tank 3	10 - 20 g	-	ND	6.71	7.25	< QL	ND
F	1	H	January	Rearing tank 1	50 - 100 g	-	5.20	5.02	< QL	5.15	< QL
	2	H	January	Rearing tank 1	50 - 100 g	-	5.19	5.44	5.48	< QL	< QL
	3	H	January	Rearing tank 1	50 - 100 g	-	6.09	4.48	< QL	5.42	5.97
	4	H	January	Rearing tank 2	2 - 5 g	-	< QL	5.64	< QL	< QL	6.16
	5	H	January	Rearing tank 2	2 - 5 g	-	6.34	ND	6.03	< QL	6.47
	6	H	January	Rearing tank 2	2 - 5 g	-	6.49	5.57	< QL	< QL	-
	7	H	January	Rearing tank 3	2 - 5 g	-	ND	ND	ND	ND	ND
	8	H	January	Rearing tank 3	2 - 5 g	-	ND	ND	ND	ND	ND
	9	H	January	Rearing tank 3	2 - 5 g	-	ND	ND	ND	ND	ND
G	1	H	January	Rearing tank 1	10 - 20 g	-	< QL	5.96	6.09	-	-
	2	H	January	Rearing tank 1	10 - 20 g	-	5.02	6.68	< QL	< QL	-
	3	H	January	Rearing tank 1	10 - 20 g	-	< QL	< QL	< QL	-	-
	4	H	January	Rearing tank 2	10 - 20 g	-	4.83	4.76	4.28	4.40	4.32
	5	H	January	Rearing tank 2	10 - 20 g	-	< QL	4.43	4.10	3.79	4.68
	6	H	January	Rearing tank 2	10 - 20 g	-	4.10	ND	4.04	< QL	4.25
	7	H	January	Rearing tank 3	10 - 20 g	-	3.98	4.22	3.39	3.12	3.60
	8	H	January	Rearing tank 3	10 - 20 g	-	3.84	4.09	4.23	< QL	3.58
	9	H	January	Rearing tank 3	10 - 20 g	-	3.79	4.11	3.98	3.74	3.90
	10	D <sup>d</sup>	June	Rearing tank 3	10 - 20 g	Ext	ND	3.48	ND	ND	ND
	11	D <sup>d</sup>	June	Rearing tank 3	10 - 20 g	Ext	2.68	< QL	ND	ND	< QL
	12	D <sup>d</sup>	June	Rearing tank 3	10 - 20 g	Ext	6.77	< QL	ND	< QL	< QL

ND : no detection of *F. psychrophilum* specific 16S rRNA gene target; < QL : *F. psychrophilum* specific 16S rRNA gene target detected but below the quantification limit.

<sup>a</sup> Visual diagnostic is H for apparently healthy and D for diseased fish, respectively.

<sup>b</sup> Tank in which fish were sampled .

<sup>c</sup> Location of infection: ext for externally visible damages (skin necrosis), and int for internal infection visible from outside (big belly).

<sup>d</sup> Antibiotic treatments (florfenicol).

<sup>e</sup> Whole body measurement. Whole fish bodies were homogenized because of their too tiny size, below 0.5 g, making it difficult to dissect out organs.

TABLE 5. Bacterial titer in fish organs according to the visual diagnostic  
(number of bacteria/g tissue, mean  $\pm$  SEM)

Tissue	Fish visual diagnostic			
	Apparently healthy <sup>a</sup>	Diseased (complete group <sup>b</sup> )	Diseased (antibiotic-treated <sup>c</sup> )	Diseased (antibiotic-free <sup>d</sup> )
Skin	$(7.9 \pm 3.1) \times 10^5$	$(6.9 \pm 3.8) \times 10^5$	$(7.6 \pm 7.9) \times 10^5$	$(6.6 \pm 4.3) \times 10^5$
Muscle	$(1.3 \pm 0.9) \times 10^6$	$(4.1 \pm 3.3) \times 10^5$	$(1.0 \pm 1.0) \times 10^5$	$(5.7 \pm 4.9) \times 10^5$
Gills	$(2.3 \pm 1.4) \times 10^6$	$(3.2 \pm 2.1) \times 10^6$	$(1.8 \pm 2.0) \times 10^3$	$(4.8 \pm 3.0) \times 10^6$
Liver	$(3.2 \pm 2.9) \times 10^7$	$(4.4 \pm 4.4) \times 10^7$	0	$(6.6 \pm 6.6) \times 10^7$
Spleen	$(2.0 \pm 1.1) \times 10^7$	$(1.6 \pm 1.7) \times 10^{12}$	0	$(2.4 \pm 2.5) \times 10^{12}$
Kidney	$(1.6 \pm 0.8) \times 10^6$	$(2.3 \pm 2.3) \times 10^{11}$	0	$(3.4 \pm 3.4) \times 10^{11}$

<sup>a</sup> n = 37 ; <sup>b</sup> n = 24 ; <sup>c</sup> n = 8 ; <sup>d</sup> n = 16.

TABLE 6. Bacterial titer in coelomic fluids from site B genitor fish

Genitor number	Bacteria/ml of coelomic fluid
103	$1.7 \times 10^5$
1,032	$4.4 \times 10^6$
1,040	$2.0 \times 10^6$
1,041	< QL
105	ND
1,053	$5.4 \times 10^5$
106	ND
1,070	$1.7 \times 10^6$
108	ND
109	< QL
110	ND
112	$5.4 \times 10^5$

ND : no *F. psychrophilum* 16S target detected

< QL : *F. psychrophilum* target detected but non quantifiable.

#### 4. Approche écotoxicologique de la relation hôte-pathogène

##### Bacterial Detection and quantification

The presence of *F. psychrophilum* was assayed in water sampled in each site. No flavobacteria could be detected whatever water sample quantified, meaning that the bacterial titer was below the detection threshold, which was calculated to be 5 bacteria / mL.

A total of 61 fish were tested for detection of *F. psychrophilum*. Six tissues, skin, muscles, gills, liver, spleen and kidney were collected from dissected fish sampled from sites A, C, D, E, F and G for bacterial titration (TABLE 4). Fish sampled from site B were not dissected but rather the whole body was homogenized because of their small size (inferior to 2 cm).

In every site, pathogen carriers were detected among the apparently healthy fish. Among a total of 27 apparently healthy fish, antibiotic-free, only 7 prove to be devoid of the pathogen. This indicates that the proportion of apparently healthy fish that carries the pathogen is unexpectedly high. Not only the proportion is great but also the bacterial titer born by these apparently healthy fish: for instance apparently healthy fish 8, 9 and 10 collected from site C feature in all of the six assayed tissues very high amount of bacteria ranging from a magnitude of 4 to 7.8. These high bacterial titers are even greater than those observed among many of the antibiotic-free diseased fish. For instances, the highest bacterial titers detected in skin and muscles were found in apparently healthy fish with magnitude of 6.89 and 7.5, respectively. Therefore quantifying bacterial titer on skin and within muscles does not allow drawing an accurate diagnostic. In fact, when considering the mean bacterial titers among fish organs only spleen and kidney allow discrimination between apparently healthy and diseased animals. The difference is greater when the comparison is made with antibiotic-free diseased fish but it remains still evident even with the complete group of diseased fish. For spleen and kidney the ratio of bacterial titer in diseased over apparently healthy fish reaches  $10^5$ , whereas it is equal to one for skin, muscles, gills and liver (TABLE 5).

In site B, 12 coelomic fluids have been aseptically sampled during a spawning manipulation of female mature rainbow trout (TABLE 6). 6 samples out of 12 featured high bacterial titers ranging from  $10^5$  to  $10^6$  bacteria / mL. Thus, healthy female genitor fish can express high amount of bacteria in their coelomic fluid easily comparing with the bacterial titers found in skin, muscles, gills and liver of apparently healthy and diseased fish. From

TABLE 7. Relative gene expression levels in diseased and apparently healthy fish organs <sup>a</sup>

Gene	Gills		Liver		Spleen		Kidney	
	Apparently healthy	Diseased						
<i>mt-a</i>	(1.5 ± 0.3) × 10 <sup>-1</sup>	(7.8 ± 1.7) × 10 <sup>-1</sup>	4.3 ± 1.0	17 ± 6	(1.1 ± 0.3) × 10 <sup>-1</sup>	(4.3 ± 1.4) × 10 <sup>-1</sup>	(7.0 ± 1.5) × 10 <sup>-1</sup>	(18 ± 8) × 10 <sup>-1</sup>
<i>il-1β</i>	(9.9 ± 3.5) × 10 <sup>-4</sup>	(72 ± 20) × 10 <sup>-4</sup>	(1.9 ± 0.7) × 10 <sup>-4</sup>	(38 ± 11) × 10 <sup>-4</sup>	(7.7 ± 4.3) × 10 <sup>-4</sup>	(38 ± 11) × 10 <sup>-4</sup>	(1.0 ± 0.2) × 10 <sup>-4</sup>	(20 ± 6) × 10 <sup>-4</sup>
<i>sod1</i>	(1.7 ± 0.6) × 10 <sup>-2</sup>	(3.3 ± 2.8) × 10 <sup>-2</sup>	(9.6 ± 2.9) × 10 <sup>-2</sup>	(5.7 ± 4.4) × 10 <sup>-2</sup>	(1.5 ± 0.9) × 10 <sup>-2</sup>	(7.2 ± 2.5) × 10 <sup>-2</sup>	(3.0 ± 1.0) × 10 <sup>-2</sup>	(1.1 ± 0.4) × 10 <sup>-2</sup>
<i>tgf-β</i>	(15 ± 8) × 10 <sup>-3</sup>	(3.7 ± 0.7) × 10 <sup>-3</sup>	(2.5 ± 0.8) × 10 <sup>-3</sup>	(3.6 ± 1.6) × 10 <sup>-3</sup>	(1.2 ± 0.7) × 10 <sup>-1</sup>	(0.3 ± 0.1) × 10 <sup>-1</sup>	(5.7 ± 4.3) × 10 <sup>-2</sup>	(9.9 ± 4.3) × 10 <sup>-2</sup>
<i>cd8-α</i>	(65 ± 37) × 10 <sup>-4</sup>	(2.8 ± 0.8) × 10 <sup>-4</sup>	(3.6 ± 0.8) × 10 <sup>-4</sup>	(13 ± 7) × 10 <sup>-4</sup>	(6.7 ± 1.8) × 10 <sup>-3</sup>	(1.4 ± 0.5) × 10 <sup>-3</sup>	(1.8 ± 0.6) × 10 <sup>-3</sup>	(1.6 ± 0.9) × 10 <sup>-3</sup>
<i>cd4</i>	(91 ± 46) × 10 <sup>-3</sup>	(8.0 ± 2.9) × 10 <sup>-3</sup>	(1.4 ± 0.9) × 10 <sup>-3</sup>	(14 ± 6) × 10 <sup>-3</sup>	(8.0 ± 3.7) × 10 <sup>-2</sup>	(5.4 ± 3.0) × 10 <sup>-2</sup>	(9.6 ± 6.5) × 10 <sup>-2</sup>	(19 ± 8) × 10 <sup>-2</sup>
<i>igm</i>	(4.1 ± 2.0) × 10 <sup>-1</sup>	(1.4 ± 0.4) × 10 <sup>-1</sup>	(5.8 ± 2.6) × 10 <sup>-2</sup>	(48 ± 18) × 10 <sup>-2</sup>	1.2 ± 0.4	1.8 ± 0.7	(8.3 ± 5.6) × 10 <sup>-1</sup>	(8.9 ± 3.3) × 10 <sup>-1</sup>
<i>igt</i>	(9.8 ± 4.3) × 10 <sup>-2</sup>	(2.3 ± 0.6) × 10 <sup>-2</sup>	(2.6 ± 2.3) × 10 <sup>-2</sup>	(3.8 ± 1.9) × 10 <sup>-2</sup>	(3.0 ± 0.9) × 10 <sup>-1</sup>	(1.0 ± 0.3) × 10 <sup>-1</sup>	(1.6 ± 0.7) × 10 <sup>-1</sup>	(76 ± 34) × 10 <sup>-1</sup>
<i>mhc2-β</i>	(6.0 ± 1.8) × 10 <sup>-1</sup>	(1.8 ± 0.5) × 10 <sup>-1</sup>	(1.6 ± 0.6) × 10 <sup>-2</sup>	(23 ± 9) × 10 <sup>-2</sup>	(9.8 ± 2.6) × 10 <sup>-1</sup>	(2.6 ± 1.0) × 10 <sup>-1</sup>	(3.0 ± 1.3) × 10 <sup>-1</sup>	(6.9 ± 4.1) × 10 <sup>-1</sup>
<i>ifn-γ</i>	(16 ± 7) × 10 <sup>-1</sup>	(2.1 ± 1.5) × 10 <sup>-1</sup>	(9.7 ± 6.4) × 10 <sup>-2</sup>	(12 ± 9) × 10 <sup>-2</sup>	1.2 ± 0.9	49 ± 31	2.0 ± 1.0	85 ± 50

<sup>a</sup> The reference gene was the housekeeping gene *act-β*.TABLE 8. Differential gene expression in organs from diseased vs apparently healthy fish (mean ± SEM)<sup>a</sup>

Gene	Function	Gills	Liver	Spleen	Kidney
<b>Stress response genes</b>					
<i>mt-a</i>	metallothionein isoform 1	+5.0*	+4.0*	+4.0*	+2.5*
<i>sod1</i>	Cu/Zn superoxide dismutase				
<b>Cytokine genes</b>					
<i>il-1β</i>	interleukin 1, β chain	+7.3*	+20.4*	+4.9*	+18.8*
<i>ifn-γ</i>	interferon γ				
<i>tgf-β</i>	transforming growth factor β			-4.4*	
<b>Cell receptor genes</b>					
<i>cd8-α</i>	cluster of differentiation 8, α chain harbored by B-lymphocytes			-4.5*	
<i>cd4</i>	cluster of differentiation 4 harbored by B-lymphocytes				
<i>mhc2-β</i>	major histocompatibility complex type 2, β chain harbored by macrophages			-3.8*	+2.3*
<b>Immunoglobulin genes</b>					
<i>igm</i>	M-like immunoglobulin		+8.2*		
<i>igt</i>	T immunoglobulin			-3.1*	

<sup>a</sup> Only statistically significant differential values are given; +: up-regulated; -: down-regulated

\*: p-value &lt; 0.05.

#### *4. Approche écotoxicologique de la relation hôte-pathogène*

10 eggs collected from site B no bacterial titer could be quantified, indicating a titer below the detection threshold calculated to be 15 bacteria / egg.

##### Gene expression analysis

Expression of 10 genes involved in general stress response and immune functions was tested in gills, liver, spleen and kidney of diseased and apparently healthy fish. The means of gene expressions (relative to *act-β* gene) are collected in TABLE 7. From the data contained in TABLE 7 the statistically significant differential expressions between diseased and apparently healthy fish tissues have been selected and displayed in TABLE 8. Two major facts are stemming from this table: 1/ the metallothionein A and interleukine β genes are overexpressed in the 4 tested tissues in diseased fish, making of these two genes good genetic markers of flavobacteriosis; 2/ the immunity genes *tgf-β*, *cd8-a*, *mhc2-β* and *igt* are repressed in diseased fish spleen.

##### Antibody titration

The IgM antibody titer has been quantified in plasma from fish sampled in various aquaculture sites. This IgM titer varied from 3.2 to 1092 UIg and no relationship could be pinpointed between IgM titer and health status or fish size or aquaculture sites (TABLE 9). Indeed, the highest IgM titers were 87 and 1092 UIg for diseased and apparently healthy fish, respectively. Unexpectedly, diseased fish do not present higher plasma IgM titers than healthy fish. Therefore, the IgM titer cannot represent a useful marker for flavobacteriosis.

#### **Discussion**

It is known that metallic pollutants can influence the fish immune system (Bols *et al.* 2001). The aim of metal titration in the fish farms selected for this study was to try to detect a possible correlation between essential metals such as iron, aluminum and zinc or trace metals such as cadmium, lead and arsenic, and bacterial proliferation and infection. In our hands, no significant correlation was found.

Bacterial detection from fish sampled in seven fish farms selected in different area of the Aquitania region confirms the very wide dissemination of *F. psychrophilum*. Thanks to a new detection method using qPCR targeting a specific area of the 16S rRNA gene, the

TABLE 9. Anti *F. psychrophilum* IgM-like titer in fish plasma

Fish weight range	2 - 10 g				10 - 20 g				20 - 50 g	50 - 100 g
	C	F	A		C	E	G	C		
Sampling site	H <sup>a, b</sup>	H	H	D	H (March)	D (March)	H	H	D	H
Visual diagnostic										
IgM-like titer (UIg)	15.9 ± 0.7	3.2 ± 1.5	282 ± 204	78 ± 76	7.7 ± 0.5	87 ± 71	159 ± 107	621 ± 299	7.8 ± 0.6	1,092 ± 468

<sup>a</sup> Unless indicated, fish were sampled in January 2010.<sup>b</sup> Visual diagnostic is H for apparently healthy and D for diseased fish, respectively.

#### 4. Approche écotoxicologique de la relation hôte-pathogène

bacteria has been detected in all sites in diseased and apparently healthy fish. Some of these fish (both apparently healthy and diseased) had been treated with antibiotic (Florfenicol) but quantification data showed that they remained bacterial carriers, and therefore represented potential reservoir for the bacterial persistence.

The eggs produced in site B are devoid of the pathogen and are sold to the other aquaculture farms. Worth to mention, the bacterial titer present in water basins from these fish farms is below the detection threshold. Yet, high bacterial titers can be found in fish grazing in these tanks. One observation deserves attention: juvenile fish collected in rearing tank 1 from site C in January were almost devoid of bacteria in their tissues and no diseased fish could be seen. However, two months later, in the same tank, diseased fish were present (around 5 % of the total fish) and even apparently healthy fish were presenting high bacterial titers in their tissues. This suggests that fish accumulate the pathogen with time and growth. So, the question arises whether the infecting bacteria comes from water or from direct contact between fish. At this point, there is no clear-cut conclusion because a single trout ventilates through its gills more than  $1 \text{ m}^3/\text{kg/day}$  ( $740 \text{ mL/kg/min}$ , (Wood and Munger 1994)). For a 40 g juvenile fish (those present in site C rearing tank 1 in March) this represents 40 L/day. Hypothesizing a water bacterial titer equal to the detection threshold (5 bacteria/mL) the ventilation rate accounts for 200 000 bacteria/day reaching the gills. This amount of bacteria is sufficient enough to explain the bacterial titers found in fish tissues. We cannot rule out a contamination through fish contact since high bacterial titers were also detected on skin, even in apparently healthy fish.

Two genes appeared to be good biomarker of flavobacteriosis: *mt-a* and *il-1 $\beta$*  which where overexpressed in gills, liver, spleen and kidney of diseased fish. This is in keeping with the finding that after intraperitoneal injection of *Yersinia ruckeri* antigens in rainbow trout, an over-expression (>100 fold) of the *il1- $\beta$*  gene was detected in spleen (Raida and Buchmann 2007). Metallothionein genes expression is stimulated by inflammatory process and oxidative stress due to inflammatory acute phase response (Inoue *et al.* 2009). The metallothionein gene response to bacterial challenge has already been observed on Atlantic cod gill epithelial cells after infection with *Vibrio angillarum* or *Aeromonas salmonicida* (Caipang *et al.*), and on fish skin after exposure to *Myxobolus cerebralis* (Baerwald *et al.* 2008). Up regulation of *mhc2- $\beta$*  gene as been described for the Atlantic salmon in various tissues including earth, liver, kidney, spleen and gills after vaccination against *A. salmonicida*, *V. angillarum* and *Vibrio*



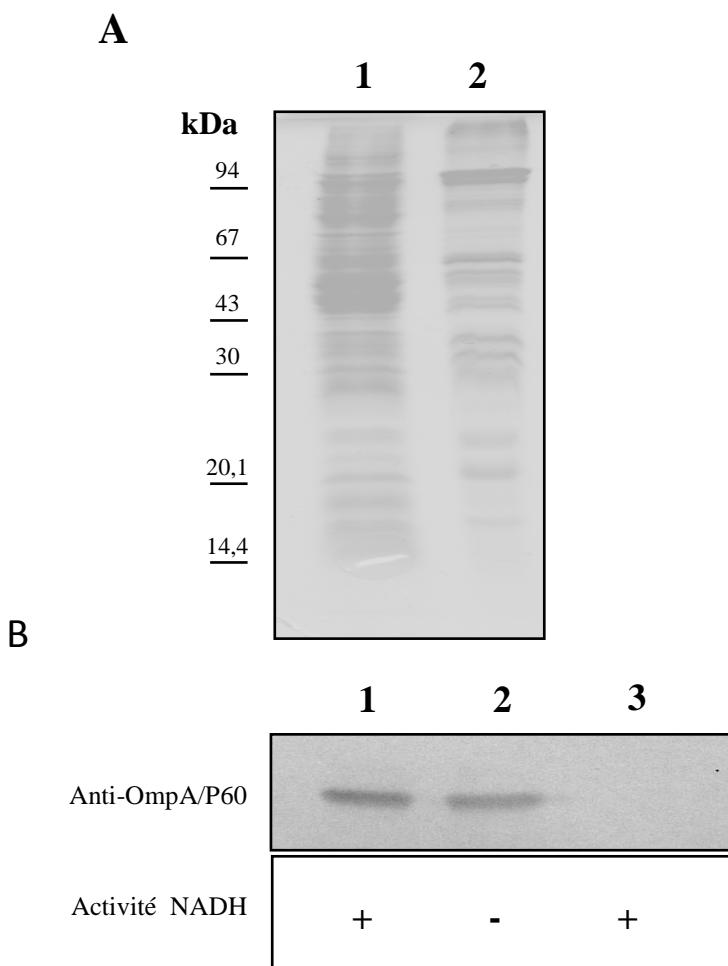
#### 4. Approche écotoxicologique de la relation hôte-pathogène

*salmonicida* (Koppang *et al.* 1998). In contrast, in the present study we found a down regulation of *mhc2-β* gene in spleen of diseased fish. This discrepancy could be linked to the fact that we observed this down regulation in diseased fish and not in vaccinated animals. Indeed, one of the causes of the disease might well be a pathogen-triggered disturbance of the immune response in spleen. Precisely, beside *mhc2-β* gene, three immune genes, namely *tgf-β*, *cd8-α* and *igt*, were down regulated in spleen of diseased fish compared to apparently healthy. Worth to note, a very high bacterial titer was found in spleen of diseased fish (above  $10^{12}$  bacteria/g of tissue) whereas a lower titer, compatible with a vaccination process, was observed in apparently healthy fish (around  $10^7$  bacteria/g of tissue). Accordingly, the highest IgM titers were found in the plasma of apparently healthy fish compared to diseased animals. The fact that vaccinated fish can mount an appropriate immune response has already been demonstrated. For instances, an increased expression of *cd8-α* gene in rainbow trout spleen has been observed after exposure to *F. psychrophilum* (Overturf and LaPatra 2006), and an increased expression of *cd8-α* and *tgf-β* genes in spleen after vaccination against *Y. ruckeri* (Raida and Buchmann 2008). The difference between vaccinated versus diseased animals can be further illustrated by the 10-fold overexpression of *igt* gene in spleen after bath vaccination with *Y. ruckeri* antigens (Raida and Buchmann 2008), whereas we observed a 3-fold repression of the same gene in the same tissue of diseased fish.

To summarize, when rainbow trout are immunized against pathogens, an over expression of immunity-involved genes such as *mhc2-β*, *tgf-β*, *cd8-α* and *igt* is observed in spleen, whereas in diseased aquacultured fish the reverse holds true, strongly suggesting that fish become sick due to a failure in an appropriate immune response. The importance of spleen in the immune response is illustrated by the fact that in rainbow trout, the less sensitive individuals to *F. psychrophilum* deleterious outcome are precisely those featuring the largest spleen, i.e. those for which the immune response is the highest in spleen (Hadidi *et al.* 2008). In fish, the two main tissues for immune response are kidney and spleen (Bromage *et al.* 2004), and it did not escape our analysis that in aquacultured diseased fish, precisely kidney and spleen are presenting the highest bacterial titers.



## **5. Travail préliminaire sur les mesures prophylactiques**



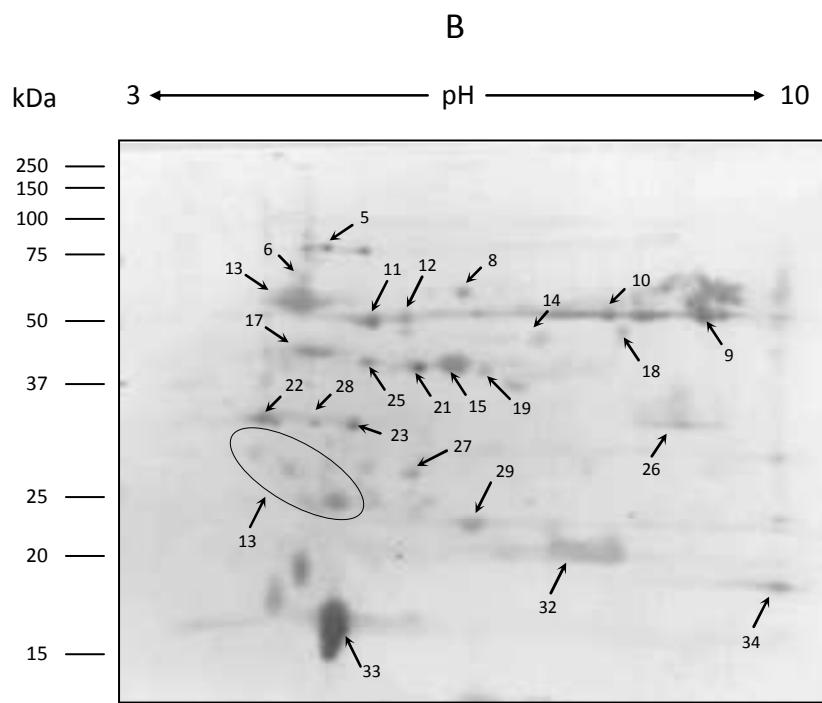
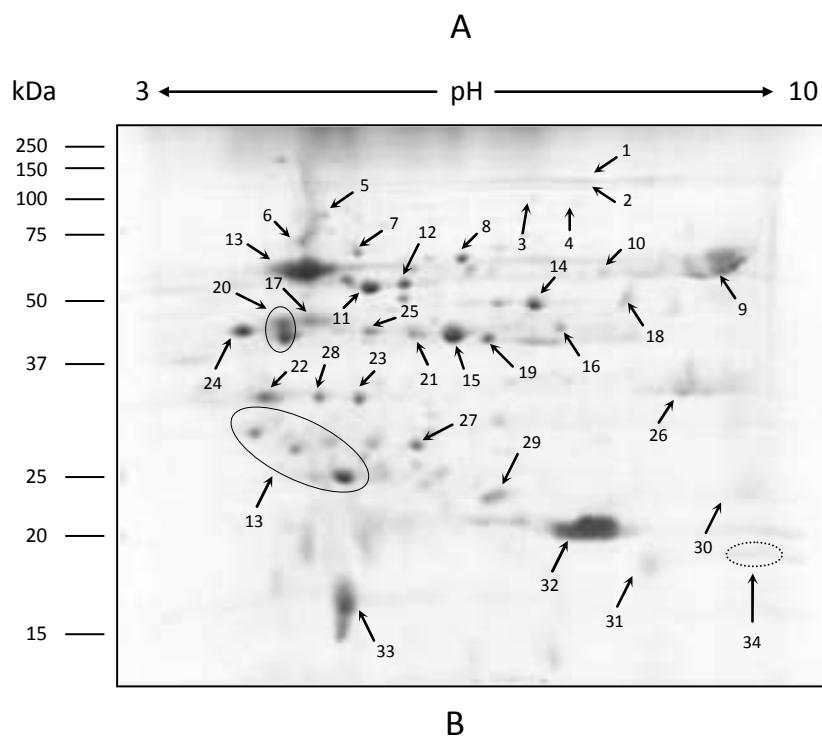
**Fig. 19.** Analyse du contenu polypeptidique de la membrane externe de *F. psychrophilum* JIP02/86 par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. Les échantillons ont été solubilisés avec du SDS à 1 %. Puits 1 : 20 µg de protéines extraites d'une suspension d'enveloppes. Puits 2 : 10 µg de protéines extraites de la fraction membranaire insoluble dans la Sarkosyl (= « membrane externe »). Puits 3 : 10 µg de protéines extraites de la fraction membranaire soluble dans la Sarkosyl (= « membrane plasmique »). Les protéines sont révélées par coloration à l'argent (A) ou avec une sérum anti-OmpA/P60 (B). Les fractions ont également été testées pour l'activité NADH oxydase (positive, + ; négative, -).

## 5.1. Recherche de déterminants antigéniques dans la membrane externe de la bactérie

### 5.1.1. Introduction

Les protéines membranaires de surface permettent les interactions des cellules avec le milieu extérieur. Dans cette membrane, les protéines jouent un rôle essentiel dans la pathogénie et constituent en même temps les cibles privilégiées du système immunitaire. Pour comprendre les mécanismes de la pathogénie et lutter contre les maladies infectieuses au moyen de vaccins, il est essentiel de connaître, outre les propriétés de ces molécules d'un point de vue de leur topologie et du contrôle de leur expression, leur capacité à interagir avec le système immunitaire de l'hôte infecté. Alors que beaucoup de travaux ont été ou sont consacrés à la classification, la détection, l'identification et la biologie moléculaire de *F. psychrophilum*, il y a curieusement peu de données relatives aux aspects moléculaires de la pathogenèse de cette bactérie.

La virulence de la flavobactérie a été suspectée d'être liée à la capacité de cette bactérie à (1) sécréter un certain nombre d'exotoxines, de métalloprotéases ou d'enzymes impliquées dans la dégradation de produits constitutifs des tissus de l'hôte (Dalsgaard 1993; Bertolini *et al.* 1994; Secades *et al.* 2001, 2003), ou également à (2) modifier la disponibilité de l'élément Fer *via* la sécrétion de sidérophores (Alvarez *et al.* 2008). Le compartiment « membrane externe » de *F. psychrophilum* doit jouer, comme chez la plupart des autres microorganismes pathogènes, un rôle clef dans ses interactions avec le milieu extérieur, en particulier avec les cellules/tissus des différents organes ainsi que le système immunitaire de l'hôte. Il a été montré qu'un certain nombre de composants de surface sont impliqués dans la pathogénicité de la flavobactérie : l'antigène-O du liposaccharide (MacLean *et al.* 2001), l'antigène 20 kDa (Crump *et al.* 2001), OmpA/P60 (Merle *et al.* 2003), OmpH/P18 (Massias *et al.* 2004), FspA (Crump *et al.* 2005). Certains de ses composants de surface sont de bons candidats « vaccin » dans la mesure où une réponse immunoprotectrice a pu être observée expérimentalement après injection chez la truite d'OmpH/P18 ou d'OmpA/P60 (Dumetz *et al.* 2006; Dumetz *et al.* 2007). Dans ce contexte, nous avons cherché à réaliser un inventaire exhaustif des protéines de la membrane externe de la souche virulente JIP02/86 de *F. psychrophilum* et à identifier un certain nombre de protéines candidates pour la réalisation de



**Fig. 20.** Analyse des protéines de la membrane externe de *F. psychrophilum* par électrophorèse bidimensionnelle. Les protéines (250 µg) de la membrane externe de *F. psychrophilum* JIP02/86 sont séparées dans un gradient de pH non linéaire dans un gel de polyacrylamide-SDS à 12 %. Les spots protéiques sont révélés après coloration au Bleu de Coomassie G-250 (A) ou immunomarquées à l'aide de sérums de truites arc-en-ciel convalescentes de la flavobactériose (B). Les différents spots identifiés sont annotés dans le tableau 22.

cocktails vaccinants à l'aide d'anticorps collectés à partir de truites convalescentes d'infection naturelle.

### 5.1.2. Résultats & Discussion

#### Analyse *in silico*

A partir des données de séquençage complet du génome de *F. psychrophilum* JIP02/86 d'une taille de 2,86 Mégabases comportant 2 432 cadres ouverts de lecture potentiels dont 1 318, soit environ 55 %, ont une fonction prédite (Duchaud *et al.* 2007), une analyse *in silico* a permis de prédire la localisation dans la membrane externe des produits d'expression d'un certain nombre de gènes. Il s'agit des gènes codant les protéines P18 (Massias *et al.*, 2004), P60 (Merle *et al.*, 2003), FspA (Crump *et al.*, 2005) ainsi que deux molécules homologues (FP0113, FP2425) à celles qui induisent une immunoprotection chez le poulet contre l'infection par *Ornithobacterium rhinotracheale* (Schuijffel *et al.* 2005), une bactérie appartenant également à la famille des *Flavobacteriaceae*. De la même manière, 35 autres protéines ont été localisées potentiellement dans la membrane externe. Ces molécules portent une signature C-terminale conservée, d'approximativement 70 acides aminés, constituée du motif suivant : [Y P N P X<sub>21-23</sub> (N/D) X<sub>2</sub> G X<sub>18-27</sub> G X Y] et qui a été retrouvée dans 170 protéines produites par des bactéries membres du phylum *Bacteroidetes*. Ce signal permettrait l'adressage et/ou l'ancre de ces molécules de surface dont certaines peuvent avoir, en raison de leur localisation, un rôle clef dans l'interaction avec l'hôte et donc dans la virulence. Il restait à vérifier expérimentalement la localisation de ces protéines, ou du moins certaines d'entre elles, dans la membrane externe de *F. psychrophilum* par une approche protéomique.

#### Préparation des protéines de la membrane externe

La bonne qualité du fractionnement bactérien est un pré-requis nécessaire pour l'analyse ultérieure du sous-protéome de la membrane externe. En effet, il a été montré que les protéines de la membrane externe sont "perdues" lors d'analyses 2D d'un protéome total ; cette sous représentation des protéines de la membrane externe n'est pas seulement due à leur faible solubilité mais dans certains cas à leur faible importance quantitative, ce qui rend difficile la détection et donc l'identification de ces macromolécules. Dans un premier temps, nous avons essayé d'isoler la membrane externe de *F. psychrophilum* à partir d'une suspension d'enveloppes par centrifugation isopycnique dans un gradient continu de

Tableau 22. Identification des protéines de la membrane externe de *F. psychrophilum* JIP02/86

N° spot	NCBI n° d'acc. <sup>b</sup>	Produit d'expression	Peptide matching	Séq. Couv.	pHi/ MM (kDa)	GRAVY score <sup>e</sup>	Site de coupe prédit <sup>c</sup>	Loc. subcel <sup>d</sup>	Hél. TM
1	FP1199	Probable outer membrane protein, Omp121 family	136/22	25.8	8.94 / 115.1	-0.285	SpI 22-23	OM	0
2	FP0144	Probable TonB-dependent outer membrane receptor	64/36	51.6	9.04 / 104.9	-0.431	SpI 18-19	OM	1
3	FP2096	Probable outer membrane protein	35/25	35.1	9.13 / 99.9	-0.437	SpI 21-22	OM	0
4	FP1500	Probable TonB-dependent outer membrane receptor	27/22	37.1	9.21 / 92.2	-0.556	SpI 19-20	OM	0
5	FP2456	Probable TonB-dependent outer membrane ferrichrome-iron receptor	13/13	21.1	8.98 / 86.5	-0.290	SpII 19-20	OM	0
	FP0690	Putative outer membrane protein involved in nutrient binding	17/17	29.7	9.22/89.5	-0.368	SpI 21-22	OM	1
6	FP1922	Probable TonB-dependent outer membrane ferrichrome-iron receptor FhuA	19/18	35.7	9.19 / 83.2	-0.300	SpI 20-21	OM	0
7	FP0521	Probable TonB-dependent outer membrane receptor	22/17	40.4	9.18 / 66.3	-0.324	SpI 18-19	OM	0
8	FP0110	Probable lipoprotein of unknown function	105/21	46.2	6.35 / 60.7	-0.225	SpII 21-22	UNK	0
9	FP1198	Probable lipoprotein of unknown function	105/15	37.8	8.18 / 58.3	-0.066	SpII 19-20	UNK	0
10	FP1402	Protein of unknown function	36/16	42.4	9.03 / 56.4	-0.462	SpI 19-20	OM	0
11	FP1346	Probable lipoprotein of unknown function	166/23	57.9	5.49 / 54.5	-0.346	SpII 20-21	UNK	1
12	FP2239	Probable lipoprotein of unknown function	93/10	27.6	5.61 / 50.4	-0.155	SpII 18-19	UNK	1
13	FP0156	Outer membrane protein OmpA family P60	364/32	68.6	4.57 / 49.4	-0.324	SpI 21-22	OM	0
14	FP0073	Protein of unknown function	15/13	40.2	6.68 / 46.3	-0.248	SpI 22-23	UNK	0
15	FP1486	Probable lipoprotein of unknown function	215/19	56.1	5.61 / 44.7	-0.168	SpII 18-19	UNK	0
16	FP2369	Bleomycin hydrolase aminopeptidase C	68/22	63.8	5.97 / 44.2	-0.454	SpI 21-22	UNK	0
17	FP0175	Probable cell surface protein (Lrr protein)	6/4	14.7	5.26 / 44.1	+0.321	SpI 16-17	UNK	1
18	FP2433	Protein of unknown function, putative outer membrane protein	17/11	27.0	9.58 / 43.6	-0.067	SpI 19-20	OM	1
19	FP2425	Probable lipoprotein of unknown function	20/12	42.0	5.70 / 43.4	-0.480	SpII-17-18	UNK	0
20	FP1478	Probable lipoprotein IrpA	137/15	49.2	4.88 / 42.4	-0.132	SpII 18-19	OM	0
21	FP0097	Flavomodulin	27/11	32.2	8.26 / 42.0	-0.185	SpII 18-19	OM	0
22	FP1456	Probable lipoprotein 'S-layer'	106/10	32.6	5.33 / 37.8	+0.074	SpII 19-20	UNK	0
23 <sup>a</sup>	FP0171	Probable cell surface protein (Lrr protein)	17/3	13.8	8.88 / 30.3	+0.239	SpI 18-19	UNK	1
	FP0172	Probable cell surface protein (Lrr protein)	17/3	11.1	8.04 / 37.2	+0.305	SpI 18-19	UNK	1
24	FP1439	Protein of unknown function FKBP-type	60/9	28.4	4.73 / 37.2	-0.506	SpII 19-20	UNK	0
25	FP0169	Probable cell surface protein (Lrr protein)	12/3	11.8	7.55 / 35.3	+0.284	SpI 16-17	UNK	0
26	FP0261	Protein of unknown function	136/15	54.5	7.82 / 34.0	-0.323	SpI 19-20	OM	1
27	FP0578	Protein of unknown function	57/9	34.7	6.10 / 29.4	-0.010	SpII 20-21	UNK	1
28	FP0451	Protein of unknown function	38/10	28.7	8.69 / 26.0	-0.593	SpII 18-19	UNK	0
29	FP2138	Protein of unknown function	6/6	31.6	5.73 / 26.2	-0.333	SpI 16-17	UNK	1
30	FP1507	Probable lipoprotein YiaD precursor	12/5	29.4	9.06 / 23.9	-0.217	SpII 21-22	OM	3
31	FP1493	Protein of unknown function	111/9	65.9	8.61 / 22.7	-0.015	SpII 19-20	UNK	0
32	FP2019	Flavobacterial-specific protein antigen FspA	176/12	83.3	9.35 / 21.3	+0.017	SpI 19-20	UNK	1
33	FP0139	Protein of unknown function	164/7	32.7	7.87 / 18.4	+0.027	SpI 18-19	OM	0
34	FP2098	Outer membrane protein OmpH family P18	35/7	48.8	8.58 / 18.7	-0.456	SpI 23-24	UNK	1

<sup>a</sup>. Les peptides identifiés n'ont pas permis de différencier les protéines de surface probables (FP0171 and FP0172).<sup>b</sup>. Les différents spots ont été annotés à l'aide de la banque génomique de *F. psychrophilum* JIP02/86 (Duchaud *et al.*, 2007).<sup>c</sup>. Le site de coupe prédict par le programme SignalP pour la séquence signal des protéines et des lipoprotéines est indiqué SpI et SpII, respectivement.<sup>d</sup>. La localisation subcellulaire prédict (OM : membrane externe ; UNK : inconnue)<sup>e</sup>. Le nombre d'hélice transmembranaire prédict et l'hydrophobicité calculée (grand average of hydrophy, GRAVY index) pour les 36 protéines identifiées l'ont été par les programmes P-SORTb v. 2.0 et ProtParam (ExPASy proteomic tools), respectivement.

saccharose. Cette approche n'a pas permis d'obtenir une fraction pure de membrane externe alors même que différentes courbes des gradients ont été utilisées. Aussi, nous avons exploité la capacité d'un détergent ionique, le lauryl sarcosinate de sodium ou Sarkosyl, à solubiliser sélectivement la membrane plasmique tout en préservant l'intégrité de la membrane externe (Rhomberg *et al.* 2004). La pureté de la préparation de membrane externe a été vérifiée par immunoempreinte en utilisant un sérum dirigé contre un marqueur spécifique de la membrane externe (OmpA/P60) et par des mesures enzymatiques en utilisant la NADH deshydrogénase comme marqueur de la membrane plasmique (**Fig. 19**). Les protéines extraites de la fraction insoluble dans le détergent ont ensuite été identifiées par spectrométrie de masse après séparation par électrophorèses 2D.

### Identification des protéines de la membrane externe résolues par analyse 2D

L'examen du profil 2-D de la souche virulente JIP02/86 de *F. psychrophilum* révèle la présence de 34 spots protéiques résolus dans une gamme de masse moléculaire apparente comprise entre 18 et 120 kDa, et qui, après une analyse par spectrométrie de masse, ont permis l'identification de 36 gènes (soit 1,5 % des 2 432 cadres ouverts de lecture prédictifs) (**Fig. 20, Tableau 22**).

La plupart des protéines identifiées (75 %) présente un index d'hydropathie ("GRAVY score") supérieur à -0,4, caractéristique de protéines hydrophobes, suggérant ainsi une association membranaire. Néanmoins, il existe des protéines membranaires chez les bactéries avec des "GRAVY scores" inférieurs à -0,4 et qui pourtant sont localisées dans des structures membranaires (ex. OspA chez *Borrelia Burgdorferi* (Bouchon *et al.* 1997)) ; la spiraline chez *Spiroplasma melliferum* (Le Henaff and Fontenelle 2000)). Il s'agit de lipoprotéines bactériennes la partie protéique (celle qui porte une fonction) est entièrement à la surface des membranes et dont l'ancrage à celle-ci est assuré *via* une partie lipidique. A l'aide du programme PSORTb v.2.0 (Gardy *et al.* 2005), seules 16 des 36 protéines identifiées sont prédictes en tant que composants de la membrane externe. A l'évidence, certains contaminants périplasmiques ou cytoplasmiques sont présents parmi les 20 autres protéines de localisation prédictive inconnue parmi lesquelles (1) PepC (spot 16) une homologue bactérienne de l'hydrolase de bléomycine (BMH), une peptidase cytoplasmique de cystéine qui est fortement conservée par l'évolution et dont la seule activité connue est l'inactivation métabolique de la

**Tableau 23.** Structure de la séquence signal des 15 probables lipoprotéines identifiées dans la membrane externe de *F. psychrophilum*

N° access NCBI	Produit d'expression	Séquence signals
FP2456	Probable TonB-dependent outer membrane	MKKKN <u>LFTILL</u> LLAVVTLYCQEKN...  
FP0110	Probable lipoprotein of unknown function	MMNTIFLRK <u>LTI</u> VLVAVFFASC...DKDFN...  
FP1198	Probable lipoprotein of unknown function	MKNKIYV <u>LLFAL</u> SPVIFSSCTDYL...  
FP1346	Probable lipoprotein of unknown function	MKKINKT <u>LLGLT</u> GLLVVTSCSDI...  
FP2239	Probable lipoprotein of unknown function	MKNKI <u>IILSIFT</u> FGFLSSCVNDTF...  
FP1486	Probable lipoprotein of unknown function	MLNE <u>KILLASLA</u> FISLASCTKDDE...  
FP2425	Probable lipoprotein of unknown function	MKK <u>LILPAIALA</u> L...  
FP1478	Probable lipoprotein LrpA	MKFFLR <u>ITLTMAG</u> I...  
FP0097	Flavomobulin	MKKTFK <u>IVTVVSL</u> IALASCSK...  
FP1456	Probable lipoprotein 'S-layer'	MKFSKL <u>FVALMSFPL</u> FF...  
FP1439	Protein of unknown function FKBP-type	MIRFFK <u>VAFIFAM</u> SLMIF...  
FP0578	Protein of unknown function	MKFQLKK <u>IMAIMAL</u> VLVF...  
FP0451	Protein of unknown function	MQKK <u>IILSIVMLT</u> TAL...  
FP1507	Probable lipoprotein YiaD precursor	MKK <u>SIIYMLSLS</u> FLLGT...  
FP1493	Protein of unknown function	MKNHFFK <u>VAVLALT</u> IFVSSC...  

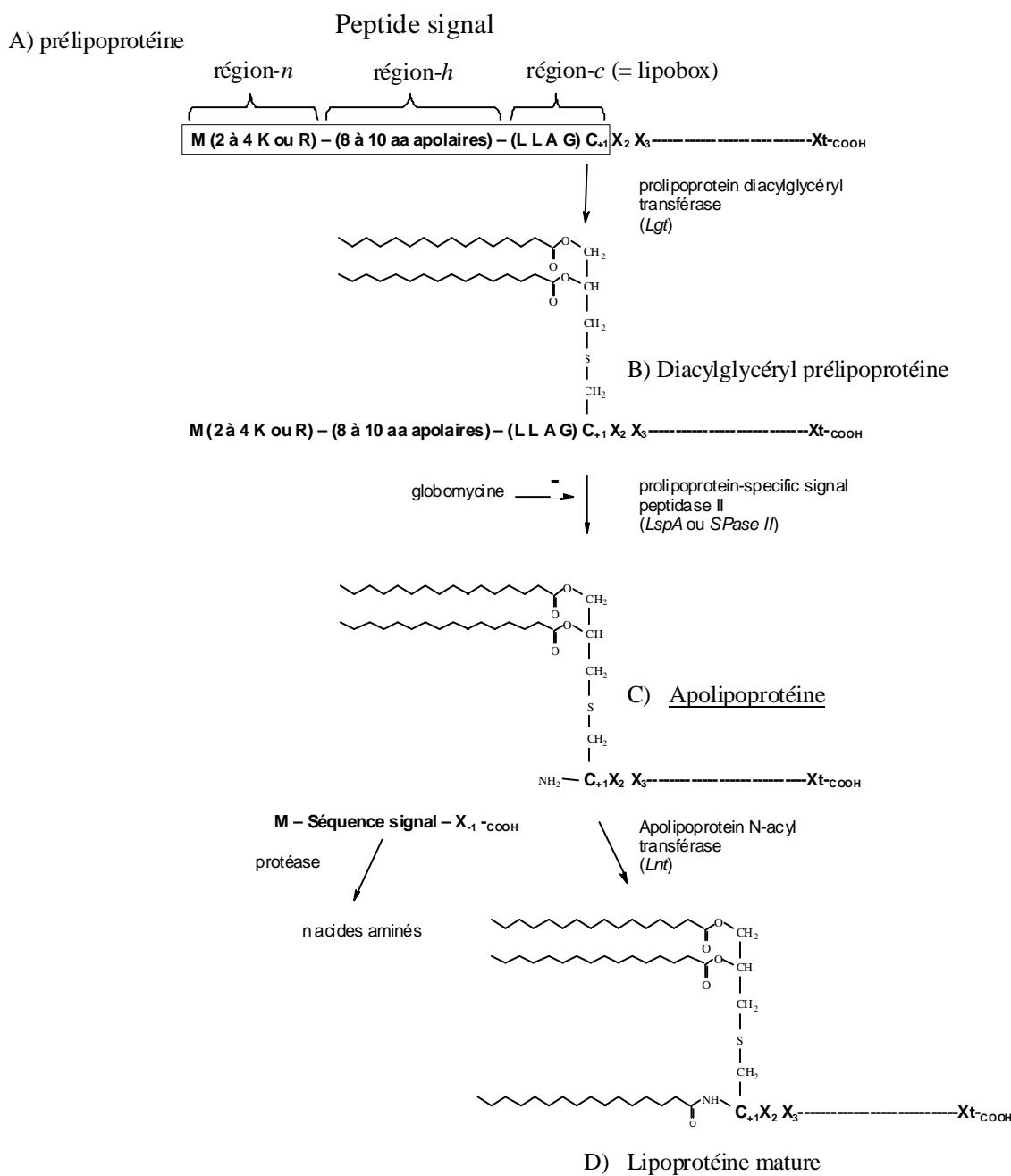
Les séquences soulignées représentent la partie apolaire des séquences signal.

## 5. Travail préliminaire sur les mesures prophylactiques

bléomycine de glycopeptide (BLM) (Mistou and Gripon 1998) et (2) FkpA/FKBP-type, une homologue possible d'une chaperonne périplasmique chez *E. coli* (Saul *et al.* 2004).

Pour prédire la présence de séquence signal permettant l'adressage des protéines dans la membrane externe, nous avons utilisé les programme d'analyse de séquences SignalP 3.0 (Nielsen *et al.* 1997; Bendtsen *et al.* 2004) et PSORTb v.2.0. Les prédictions montrent que toutes les protéines identifiées possèdent une extrémité N-terminale qui présente des potentialités de séquence signal. Cette observation suggère que le système de sécrétion Sec-dépendant est la voie privilégiée qui contribue au transport des protéines à travers la membrane plasmique. Certaines (21) sont synthétisées sous la forme d'une préprotéine dont la maturation s'effectue par coupure de la séquence signal N-terminale (une vingtaine d'acides aminés) *via* la SignalPeptidase I (SPase I) ; les 15 autres sont prédictes en tant que lipoprotéines bactériennes classiques (**Tableau 23**). Les précurseurs des lipoprotéines présentent une extension N-terminale caractéristique avec trois parties distinctes : (1) une partie N-terminale comprenant la méthionine d'initiation et quelques résidus chargés positivement (Arg ou Lys) (région *n*) ; (2) une région centrale apolaire d'une quinzaine d'acides aminés (région *h*) ; et (3) une partie C-terminale (région *c* ou lipobox), site de clivage de la séquence signal (**Fig. 21**). Ces molécules suivent une maturation post-traductionnelle analogue à celle décrite pour la lipoprotéine de Braun d'*E. coli* (Sankaran *et al.* 1995), à savoir : (1) addition d'un diglycéride sur la cystéine présente dans la lipobox ; (2) coupure de la séquence ; (3) addition d'une 3<sup>e</sup> chaîne d'acide gras sur la fonction NH<sub>2</sub> de la diacylglycéryl cystéine qui vient d'être libérée. Ces réactions font intervenir les trois enzymes suivantes : la prolipoprotein diacylglycéryl transférase (Lgt), la prolipoprotein-specific signal peptidase II (LspA ou SPase II) et lapolipoprotein *N*-acyl transférase (Lnt). Les gènes qui codent potentiellement la Lgt (FP0600) et la LspA (FP0219) ont bien été identifiés dans le génome de *F. psychrophilum* (Duchaud *et al.* 2007), mais pas celui codant la Lnt. Soit ce gène est absent soit, comme chez les bactéries Gram positives, *Bacillus subtilis* (Tjalsma *et al.* 1999; Sutcliffe and Harrington 2004) par exemple, il n'a pas pu être identifié dans le génome de la flavobactérie. Il reste à caractériser biochimiquement les lipoprotéines candidates de *F. psychrophilum* (diacylation/triacylation) pour lever l'ambigüité sur l'existence ou non d'un gène "Lnt-like" chez les flavobactéries.

Quelques protéines sont résolues en multi-spots dont OmpA/P60 (spot 13, FP0156 ; **Fig. 20**) suggérant l'existence de modifications post-traductionnelles. En effet, de telles



**Fig 21.** Schéma général de la voie de maturation des lipoprotéines bactériennes.

modifications modifient le pH<sub>i</sub> de la protéine sans affecter sa masse moléculaire apparente puisque ces modifications s'effectuent sur la/les chaîne(s) latérale(s) des protéines. Cette interprétation est cohérente avec ce qui a été montré précédemment pour OmpA/P60. En effet, il s'agit d'une glycoprotéine (Merle *et al.*, 2003) dont la glycosylation hétérogène provoquerait la résolution en plusieurs spots de la molécule. Par ailleurs, la présence de nombreux spots (entourés par un cercle plein) identifiés comme OmpA/P60 pour des masses moléculaires inférieures comprises entre 25 et 30 kDa suggère également une dégradation possible de cette glycoprotéine majoritaire au cours de la préparation de l'échantillon. De même, la protéine IrpA pour "Iron regulated protein" (spot 20, FP1478) est retrouvée dans deux spots qui présentent un même pH<sub>i</sub> mais avec une différence dans la masse moléculaire apparente estimée à moins de 3 kDa. Cette probable lipoprotéine impliquée dans l'acquisition/métabolisme du fer semble être présente dans la membrane externe de *F. psychrophilum* sous deux formes, immature et mature après clivage du peptide signal.

Le système de sécrétion Sec-indépendant semble également être fonctionnel chez *F. psychrophilum* puisque deux composants potentiels du système de sécrétion de type 1 ont été identifiés, il s'agit de FP0880 « Probable multidrug resistance protein, AcrB/AcrD/AcrF family protein » et de FP0296 « Probable outer membrane efflux protein-TolC ». Chez les bactéries Gram négatives, le complexe d'efflux TolC a été décrit comme une pompe constituée de trois éléments : la protéine TolC dans la membrane externe, une protéine spécifique de la membrane plasmique (ex. AcrB), et une protéine périplasmique de connexion (adaptateur comme AcrA) (Fernandez-Recio *et al.* 2004). Cette pompe permet l'export de petites molécules du cytoplasme vers la surface bactérienne, à travers les membranes, sans impliquer l'espace périplasmique. Ce système d'efflux pourrait avoir un rôle important dans la colonisation des poissons et l'adhérence aux cellules cibles par *F. psychrophilum* comme il a été montré lors de l'infection du poulet par *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (Buckley *et al.* 2006). De manière surprenante, l'analyse 2-D n'a pas permis d'identifier plusieurs protéines impliquées potentiellement dans l'efflux dont la présence dans la membrane externe avait été clairement mise en évidence au cours d'une analyse préliminaire 1-D (Duchaud *et al.*, 2007). En tant que protéines transmembranaires, il est possible qu'elles n'aient pas été solubilisées au cours de l'étape d'extraction par le tensioactif, ou qu'elles n'aient pas focalisé lors de la première dimension, ou encore qu'elles soient en trop faibles quantités pour être matérialisées sous la forme d'un spot.



## 5. Travail préliminaire sur les mesures prophylactiques

L'acquisition du fer est souvent un facteur limitant dans la croissance bactérienne en raison de l'insolubilité du Fer(III) mais également parce que les mammifères utilisent des chélateurs du fer (lactoferrine ; transferrine ; hémoglobines), réduisant ainsi la disponibilité l'élément pour d'éventuels pathogènes (Bullen *et al.*, 2005). Certaines protéines potentiellement impliquées dans l'acquisition du fer ont été identifiées dans la membrane externe de *F. psychrophilum*. Il s'agit d'une protéine appartenant à la famille des Omp121 (spot 1, FP1199), cinq probables récepteurs membranaire TonB-dépendant (spot 2, FP0144 ; spot 4, FP1500 ; spot5, FP2456 ; spot 6, FP1922 ; et spot 7, FP0251), et d'un composant potentiellement impliqué dans la régulation du fer (spot 20, FP1478, "Iron regulated protein A"). Des études fonctionnelles sont bien évidemment nécessaires pour vérifier l'implication réelle de ces éléments dans l'acquisition du fer et dans la virulence de la flavobactérie. Néanmoins, il a été montré que les composants du système Ton-B, essentiels à la survie des bactéries pathogènes dans leurs environnements, sont des facteurs de virulence et les cibles privilégiées du système immunitaire de l'hôte infecté comme le récepteur de sidérophores, FhuA chez *Haemophilus parasuis* par exemple (Del Rio *et al.* 2006).

Plusieurs autres protéines connues et pour partie caractérisées ont été retrouvées dans la membrane externe de *F. psychrophilum*, en particulier les protéines OmpH/P18 (spot 34, FP2098 ; Massias *et al.*, 2004 ; Dumetz *et al.*, 2006), OmpA/P60 (spot 13, FP0156 ; Merle *et al.*, 2003 ; Dumetz *et al.*, 2007), FspA (« flavobacterial specific protein antigen ; spot 32, FP2019 ; Crump *et al.*, 2005). Toutes sont impliquées dans des interactions avec l'hôte poisson dans la mesure où il a été montré qu'elles sont immunomarquées en présence d'anticorps sériques collectés à partir d'un pool de truites convalescentes de la flavobactériose. Plusieurs autres protéines ou lipoprotéines avec des fonctions non connues ont été identifiées dans la membrane externe de *F. psychrophilum*, parmi lesquelles quatre probables protéines de surface contenant des motifs répétés enrichis en leucine (« Leucine rich repeat proteins » ou Lrr proteins ; spot 25, FP0169 ; spot 23, FP0171 et/ou FP0172 ; spot 17, FP0175). Ces molécules présentent des similarités avec les protéines BspA et LrrA produites par *Tannerella forsythensis* (Inagaki *et al.* 2005; Inagaki *et al.* 2006) et par *Treponema denticola* (Ikegami *et al.* 2004), respectivement. Chez ces bactéries pathogènes de la sphère parodontale, ces antigènes de surface ont été décrits comme des immunogènes majeurs impliqués dans les interactions avec les tissus hôtes et donc, dans la virulence. Une lipoprotéine (spot 22, FP1456) pourrait également participer à la formation d'une couche protéique de surface de type S. Enfin, une protéine (flavomoduline, spot 21, FP0097) présente



des propriétés des cytolysines activées par les thiols ; il s'agit de toxines très conservées qui, libérées dans le milieu extérieur, ciblent le cholestérol des membranes biologiques des eucaryotes pour y former des pores. Elles peuvent interagir avec les cellules de l'immunité et induisent la production de cytokines (Billington *et al.* 2000).

### Identification des immunogènes protéiques de la membrane externe

A l'aide d'un pool de sérum de truites arc-en-ciel convalescentes d'une flavobactériose naturelle, nous avons cherché à visualiser les antigènes immunodominants dans la membrane externe de *F. psychrophilum* (**Fig. 20B**).

Un premier groupe d'immunogènes majeurs comprend des molécules qui ont précédemment été bien décrites. Il s'agit des protéines FspA, OmpA/P60 et OmpH/P18. Pour cette dernière, l'immunomarquage est clairement visible (spot 34, **Fig. 20B**) alors que le spot protéique est très peu coloré avec le Bleu de coomassie G-250 (spot 34 entouré, **Fig. 20A**). En tant que composant adsorbé sur la face extérieure de la membrane externe de *F. psychrophilum*, OmpH/P18 est très largement perdue au cours du traitement de la suspension d'enveloppes par le Sarkosyl lors de la préparation de la fraction "membrane externe" de la flavobactérie (Dumetz *et al.*, 2006). Aussi, l'observation d'un immumarquage intense souligne la forte immunogénicité d'OmpH/P18. Dans l'enveloppe des eubactéries Gram négatives, les protéines de la famille des OmpA sont des molécules abondantes impliquées dans des fonctions diverses, en particuliers celles en lien avec l'environnement direct du microorganisme (Smith *et al.* 2007). Nous montrons ici qu'OmpA/P60 (spot 13, **Fig. 20B**) est un antigène immunodominant dans la membrane externe de *F. psychrophilum*. Des cocktails constitués d'OmpA/P60 se sont révélés protecteurs lors d'essais de vaccination réalisés sur poisson (Dumetz *et al.*, 2007). La protéine FspA est également un immunogène majeur de la membrane externe (spot 32, **Fig. 20B**). Il s'agit d'une protéine qui présente quelques homologies de séquence avec une protéine de 17 kDa, identifiée dans la membrane externe de *Yersinia pseudotuberculosis*, impliquée dans l'interaction du pathogène avec les cellules hôtes (Yang *et al.* 1996). Bien qu'il ne soit pas possible d'attribuer de rôles spécifiques à ces composés membranaires dans l'interaction de *F. psychrophilum* avec l'hôte-poisson, ces antigènes de surface présentent les qualités requises pour être retenus lors des essais de formulation de vaccins protecteurs de la flavobactériose chez le poisson.



## 5. Travail préliminaire sur les mesures prophylactiques

Le second groupe d'immunogènes comprend un nombre important de protéines ou lipoprotéines qui n'ont pas d'homologues chez les bactéries appartenant à des phyllums distincts des CFB. Nous retrouvons les quatre probables protéines de surface identifiées précédemment (Lrr proteins) mais également un composant particulièrement intéressant (spot 33, **Fig. 20B** ; FP0139) en raison d'intensité de l'immunomarquage observé qui traduit la présence d'un haut titre en anticorps dirigés contre lui. Il reste à identifier cette molécule et à montrer que les anticorps produits sont protecteurs.

Au cours de cette étude, nous avons réalisé une analyse protéomique de la membrane externe de *F. psychrophilum* qui révèle la présence d'un certain nombre de protéines qui avaient été précédemment identifiées comme les protéines OmpA/P60 (Merle *et al.*, 2003) ou FspA (Crump *et al.*, 2005) mais également un certain nombre d'autres molécules dont, pour une majorité d'entre elles, les fonctions dans la membrane externe restent à définir. Ce travail est susceptible de constituer une base pour comparer des échantillons de « membrane externe » préparés à partir de *F. psychrophilum* cultivé sous conditions biologiques différentes. Il devrait en particulier être possible de corrélérer la présence de marqueurs de surface chez la flavobactérie avec les conditions physiologiques de l'environnement (température, stress ioniques, ...). Par ailleurs, nous avons identifié un certain nombre d'antigènes immunoréactifs, qui pourraient constituer des antigènes potentiels pour le développement de nouveaux vaccins.



## Analysis of the *Flavobacterium psychrophilum* outer-membrane subproteome and identification of new antigenic targets for vaccine by immunomics

Fabien Dumetz<sup>1</sup>, Eric Duchaud<sup>2</sup>, Stephane Claverol<sup>3</sup>, Nicolas Orieux<sup>4</sup>, Sandrine Papillon<sup>4</sup>, Delphine Lapaillerie<sup>3</sup> and Michel Le Hénaff<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Unité de microbiologie de l'alimentation au service de la santé humaine, INRA, Domaine de Vilvert, F-78352 Jouy-en-Josas Cedex, France.

<sup>2</sup>Unité de virologie et immunologie moléculaire, INRA, Domaine de Vilvert, F-78352 Jouy-en-Josas Cedex, France.

<sup>3</sup>Plateforme génomique fonctionnelle, Université Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, F-33076 Bordeaux Cedex, France.

<sup>4</sup>UMR CNRS 5805 EPOC, Place du docteur Peyneau, F33120 Arcachon, France.

Microbiology (2008) 154, 1793-1801



# Analysis of the *Flavobacterium psychrophilum* outer-membrane subproteome and identification of new antigenic targets for vaccine by immunomics

Fabien Dumetz,<sup>1</sup>† Eric Duchaud,<sup>2</sup> Stéphane Claverol,<sup>3</sup> Nicolas Orieux,<sup>1</sup> Sandrine Papillon,<sup>1</sup> Delphine Lapaillerie<sup>3</sup> and Michel Le Hénaff<sup>1</sup>

Correspondence  
Michel Le Hénaff  
m-lehenaff@enitab.fr

<sup>1</sup>Université Bordeaux 1, CNRS UMR 5805 EPOC, Place du Dr Peyneau, F-33120 Arcachon, France

<sup>2</sup>Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires, INRA, Domaine de Vilvert, F-78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

<sup>3</sup>Plateforme Génomique Fonctionnelle, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 Rue Léo Saignat, F-33076 Bordeaux Cedex, France

Received 10 January 2008  
Revised 18 February 2008  
Accepted 6 March 2008

*Flavobacterium psychrophilum* is an important infectious Gram-negative bacterium causing cold-water disease (CWD) and rainbow trout fry syndrome. Outer-membrane proteins (OMPs) are key molecules with regard to the interface between the cell and its environment. Therefore, we sought to define the outer-membrane (OM) subproteome of *F. psychrophilum* in order to gain insight into the biology and pathogenesis of this bacterium and to identify the dominant antigens targeted by the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune system during infection. First, OM were prepared from a cell-envelope suspension by differential Sarkosyl (sodium lauryl sarcosinate) solubility. We then isolated the OMPs and identified 36 proteins from 34 spots resolved by two-dimensional electrophoresis and LC-MS/MS. An immunoproteomic approach using antibodies from CWD-convalescent rainbow trout was then used to identify 25 immunoreactive *F. psychrophilum* antigens that may be relevant in pathogenesis and diagnosis. These included the previously characterized surface-exposed OMPs OmpA, OmpH/P18 and FspA, as well as newly described antigenic proteins. This study provides a number of novel candidate proteins for developing vaccine(s) against flavobacteriosis infection in aquaculture.

## INTRODUCTION

*Flavobacterium psychrophilum* is a yellow-pigmented, Gram-negative, gliding bacterium that predominantly affects salmonid fish (Borg, 1960), such as coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) or rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and occasionally other fish species, such as ayu (*Plecoglossus altivelis*) (Iida & Mizokami, 1996). This bacterium is therefore responsible for considerable economic losses in fish aquaculture. Infections with *F. psychrophilum* have several clinical manifestations, the most significant of which include mortality associated with haemorrhagic septicaemia and spleen hypertrophy in juvenile fish, referred to as rainbow trout fry syndrome, and in adults, septicaemia preceded by extensive necrotic

lesions, called cold-water disease (CWD) (Bernardet & Bowman, 2006). However, the actual mechanism of pathogenesis is not well understood, although virulence has been suspected to be related to the ability of *F. psychrophilum* to produce exotoxins (Dalsgaard, 1993), extracellular metalloproteases (Fpp1-2; Secades *et al.*, 2001, 2003) or enzymes involved in the degradation of products such as chondroitin sulfate, collagen and fibrinogen (Bertolini *et al.*, 1994). Clearly, the flavobacterial outer membrane (OM) is important when we consider interactions of bacteria with host cells and tissues in the context of pathogenesis and immunity to infection. Several surface components of *F. psychrophilum* have been implicated in flavobacterial pathogenesis and identified as possible vaccine and diagnostic candidate macromolecules; they include lipopolysaccharide O antigen (MacLean *et al.*, 2001) and surface-exposed antigens [e.g. 20 kDa antigen (Crump *et al.*, 2001) and OmpA (Merle *et al.*, 2003; Dumetz *et al.*, 2007)], some of which may be good candidates for an *F. psychrophilum* subunit vaccine, such as the surface-localized *Flavobacterium*-specific protein (FspA; Crump *et al.*, 2005). Indeed, a protective immune

†Present address: Institut Pasteur, CNRS URA 2172, Unité des Toxines et Pathogénie Bactérienne, 75015 Paris, France.

Abbreviations: ACN, acetonitrile; ASB-14, 3-[*N,N*-dimethyl(3-myristoylaminopropyl)ammonio]propanesulfonate; CWD, cold-water disease; GRAVY, grand average of hydrophy; OM, outer membrane; OMP, outer-membrane protein; Sarkosyl, sodium lauryl sarcosinate.

response has been shown experimentally in rainbow trout by P18 (Massias *et al.*, 2004), a surface-exposed protein belonging to the OmpH family (Dumetz *et al.*, 2006).

Elucidation of the *F. psychrophilum* genome sequence has provided information about the structure and function of flavobacterial proteins (Duchaud *et al.*, 2007). Proteomic analysis is a useful approach for examination of global protein synthesis and is particularly good as an indicator of gene expression in bacteria. Such analyses have allowed identification of virulence determinants, antigens and vaccine candidates for many bacterial pathogens (e.g. *Pasteurella multocida*; Boyce *et al.*, 2006), since changes in the proteome depend on developmental stage, disease state and environmental conditions. Recently, an immunoproteomic analysis of a virulent and a non-virulent strain of *F. psychrophilum* has been done to identify possible factors associated with virulence and to identify specific proteins recognized by the host immune response (Sudheesh *et al.*, 2007). Only minor differences were seen between the two strains when total cell proteins were analysed and four immunogenic proteins were conclusively identified: the heat-shock proteins HSP60 and HSP70, ATP synthase and thermolysin. The ribosomal L10-like protein also seems to elicit a protective response in fish (Crump *et al.*, 2007). Are such antigens promising candidates for vaccine development? Indeed, *F. psychrophilum* OM preparations (Rahman *et al.*, 2002) and a highly enriched fraction of the surface-exposed antigen OmpH/P18 (Dumetz *et al.*, 2006) have been shown previously to be involved in fish protection against infection. Moreover, it has been demonstrated that OM proteins (OMPs) are depleted in two-dimensional (2-D) electrophoresis displaying whole-cell extracts (Santoni *et al.*, 2000). The common under-representation of OMPs is not only due to their poor solubility, but also sometimes to low expression levels, which renders detection and thus identification difficult. As they are located on the bacterial surface, OMPs are likely to interact with the environment and, particularly, with the host immune system. Therefore, the aims of our study were (i) to perform subcellular fractionation and subsequent enrichment of OMPs with the ionic detergent sodium lauryl sarcosinate (Sarkosyl), (ii) to systematically define the protein content of the OM from the virulent *F. psychrophilum* strain JIP02/86 and (iii) to identify a number of candidate proteins as possible vaccine targets probed with antibodies collected from naturally infected fish.

## METHODS

***F. psychrophilum* cell culture.** *F. psychrophilum* strain JIP02/86 (INRA, Jouy-en-Josas, France) was used in this study. Cells were cultured in a modified Anacker & Ordal's (AOAE) liquid medium supplemented with 5% bovine serum under standard growth conditions (Dumetz *et al.*, 2006). Purity was checked at the end of growth ( $OD_{600}=0.8$ ) by examination of Gram-stained smears. Cells were collected by centrifugation at 6000 g for 10 min at 4 °C. Following removal of supernatant and two washing steps with PBS

(50 mM sodium phosphate buffer, 150 mM NaCl, pH 7.4), the pellet was dispersed into cold water supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche). Flavobacteria were disrupted by 10 repeated ultrasonication steps (24 W, 10 s, 0 °C). Unbroken cells and cellular debris were removed by centrifugation at 10 000 g for 10 min at 4 °C. Cell envelopes were recovered by an ultracentrifugation step (260 000 g, 15 min, 4 °C) in a Beckman Coulter MicroUltracentrifuge Optima TLX in TLA-110 rotor. Then they were washed twice with PBS.

**Sucrose density-gradient centrifugation.** Whole-cell envelope suspension (200 µl per tube) was applied to the discontinuous sucrose density gradient (20–60%, w/w, sucrose in 5 mM EDTA) reported previously for the separation of inner- and outer-membrane vesicles from *Escherichia coli* (Osborn & Munson, 1974). The gradients were ultracentrifuged (215 000 g, 24 h, 4 °C) and fractions were collected by piercing the bottom of each tube with an 18-gauge syringe needle.

**OM preparation by differential solubility in Sarkosyl.** The OM fraction was isolated from the *F. psychrophilum* cell envelope with the ionic detergent Sarkosyl (Sigma) as described for the bacterial pathogen *Bartonella henselae* (Rhomberg *et al.*, 2004). Briefly, whole-cell envelopes were dispersed in 1 vol. 10 mM HEPES buffer (pH 7.4) and this envelope suspension was treated with 1 vol. 2% Sarkosyl in the same buffer at room temperature for 20 min. The insoluble material (i.e. the OM fraction) was collected by ultracentrifugation and washed twice with HEPES buffer to remove residual traces of detergent contaminants.

**Protein and enzyme assays.** The OMP content was estimated using our standard procedures (Merle *et al.*, 2003). The OM preparation was finally adjusted to 10 mg protein ml<sup>-1</sup> and stored at -80 °C. NADH dehydrogenase activity was measured as an indicator for inner-membrane contamination of the OM preparation (Kasahara & Anraku, 1974).

**Electrophoresis.** SDS-PAGE analyses were performed in polyacrylamide gel slabs (10 × 8 × 0.075 cm; 10% acrylamide, 0.26% bisacrylamide; 200 V, 1 h) (Laemmli, 1970). 2-D electrophoresis was performed following the ZOOM IPG runner system procedure described by Invitrogen with the following modifications. To generate an electrophoretic map of OMPs, about 200 µg protein extract was mixed in 160 µl IPG rehydration buffer [7 M urea, 2 M thiourea, 2% 3-[N,N-dimethyl(3-myristoylaminopropyl)ammonio]propanesulfonate (ASB-14), 25 mM dithiothreitol, 0.01% bromophenol blue, 1%, v/v, carrier ampholytes 3-10 (Invitrogen)]. After sonication, samples were clarified by centrifugation (5000 g, 5 min, 20 °C), loaded on 3–10 NL IPG ZOOM strips (Invitrogen) and allowed to swell overnight. The following IEF parameters were applied: (i) 200 V for 20 min, (ii) 450 V for 15 min, (iii) 750 V for 15 min, and (iv) 2000 V for 30 min. After the focusing was complete, IPG ZOOM strips were sequentially equilibrated in two equilibration buffers: buffer I (6 M urea; 50 mM Tris; 2% SDS; 30% glycerol; 50 mM dithiothreitol) and buffer II (6 M urea; 50 mM Tris; 2% SDS; 30% glycerol; 125 mM iodoacetamide). The separation in the second dimension was performed on SDS-PAGE (12% polyacrylamide) for 2 h under a constant voltage of 120 V. Following the electrophoretic runs, gels containing proteins were stained with Coomassie brilliant blue G-250.

**Protein detection by immunoblotting.** Proteins separated by SDS-PAGE or by 2-D IEF/SDS-PAGE were electroblotted onto a nitrocellulose filter (Bio-Rad) using a Bio-Rad TransBlot electrokinetic transfer cell as specified by the manufacturer. The blots were blocked with 5% BSA in PBS for 1 h at room temperature and then incubated for 1 h with anti-*F. psychrophilum* OmpA rabbit serum (Dumetz *et al.*, 2007), with a pool of antisera (dilution 1:2000 in

0.05% Tween 20 in PBS) collected from 20 healthy trout (generously given by Scott E. LaPatra, Clear Springs Foods, Inc., Buhl, Idaho, USA) or with a pool of antisera (dilution 1:1000 in 0.05% Tween 20 in PBS) collected from 20 CWD-convalescent trout taken from an infected French farm. The washing steps were performed three times with PBS-Tween 20. An additional incubation was made with a rabbit antiserum anti-trout immunoglobulin (dilution 1:2000); the primary antibodies were from trout antiserum. Bound antibodies were visualized on immunoblots using an incubation step with alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG antibodies (dilution 1:2000; DakoCytomation), followed by a colour reaction with an NBT/BCIP cocktail (4-nitroblue tetrazolium chloride; 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate).

**Protein identification by LC-MS/MS, data interpretation and database searching.** Protein spots selected for analysis were manually excised from the 2-D gels and destained in H<sub>2</sub>O/acetonitrile (ACN) (50:50). Spots were subsequently rinsed twice in ultrapure water and shrunk in ACN for 10 min. After removal of ACN, gel pieces were dried at room temperature, covered with trypsin solution (10 ng ml<sup>-1</sup> in 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), rehydrated at 4 °C for 10 min and finally incubated overnight at 37 °C. Spots were then incubated for 15 min in 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> at room temperature with rotary shaking. The supernatant was collected and an H<sub>2</sub>O/ACN/HCOOH (47.5:47.5:5) extraction solution was added onto the gel slices and left for 15 min. The extraction step was repeated twice. Supernatants were pooled and concentrated in a vacuum centrifuge to a final volume of 25 µl. Digests were finally acidified by addition of 1.5 µl 5% acetic acid and stored at -20 °C. The peptide mixture was analysed by online capillary HPLC (300 µm × 5 mm C18 PepMap trap column; LC Packings) coupled to a nanospray LCQ IT mass spectrometer (Thermo Finnigan). The samples used were 10 µl of the peptide digests. The flow rate was set at 200 nl min<sup>-1</sup>. Solvent A was used for column equilibration (0.1% formic acid in 5% ACN) and solvent B was 0.1% formic acid in 80% ACN. Peptides were eluted with a 5–50% linear gradient of solvent B for 30 min. The mass spectrometer operated in positive ion mode at a 2 kV needle voltage and a 46 V capillary voltage. Data were acquired in data-dependent mode alternating an MS scan survey over the range *m/z* 300–2000 and three MS/MS scans in an exclusion dynamic mode. MS/MS spectra were acquired using a 2 *m/z* units ion isolation window, a 35% relative collision energy and a 0.5 min dynamic exclusion duration. Data were searched by SEQUEST through the Bioworks 3.2 interface (Thermo Finnigan) against the *F. psychrophilum* complete proteome database (Duchaud *et al.*, 2007). Data files were generated for MS/MS spectra that reached both a minimal intensity ( $5 \times 10^4$ ) and a sufficient number of ions (Fraser *et al.*, 1999). Generation of the data file allowed the averaging of several MS/MS spectra corresponding to the same precursor ion with a tolerance of 1.4 Da. Spectra from precursor ions higher than 3500 Da or lower than 500 Da were rejected. The search parameters were as follows: mass accuracy of the peptide precursor and peptide fragments was set to 1.5 Da and 0.5 Da, respectively. Only b- and y-ions were considered for mass calculation. Oxidation of methionines (+16) and carbamidomethylation of cysteines (+57) were considered as differential modifications. Two missed trypsin cleavages were allowed. Only peptides with Xcorr values higher than 1.5 (single charge), 2 (double charge) and 2.5 (triple charge) were retained. In all cases,  $\Delta C_n$  had to be greater than 0.1. All protein identifications were based on a minimum of two peptide assignments. To be considered, the protein spot had to show a reproducible pattern in three gels which had been run separately.

**In silico analysis.** Protein homology searches were carried out with the SWISS-PROT database with the BLAST (Altschul *et al.*, 1990; Schäffer *et al.*, 2001) and FASTA (Pearson, 1990) algorithms. Identification of peculiar domains in proteins was conducted using the HMMFFAM program in the HMMER package with the Pfam HMM

library (www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/) (Finn *et al.*, 2006). Prediction of membrane-spanning regions and their orientation was performed using the TMpred program (Hofmann & Stoffel, 1993). Membrane anchor and signal peptides were analysed with LipoP 1.0 and SignalP 3.0 software (www.cbs.dtu.dk/services/) (Nielsen *et al.*, 1997; Juncker *et al.*, 2003; Bendtsen *et al.*, 2004). The subcellular locations of OM candidates were predicted using the program PSORTb v. 2.0 (www.psorth.org/psortb/) (Gardy *et al.*, 2005). The hydrophobicity of proteins was estimated using the grand average of hydropathy (GRAVY) value (ProtParam program; ExPASy proteomics tools, www.expasy.org/tools/protparam.html) as the sum of the hydropathy value of all amino acids divided by the length of the amino acid sequence (Kyte & Doolittle, 1982).

## RESULTS AND DISCUSSION

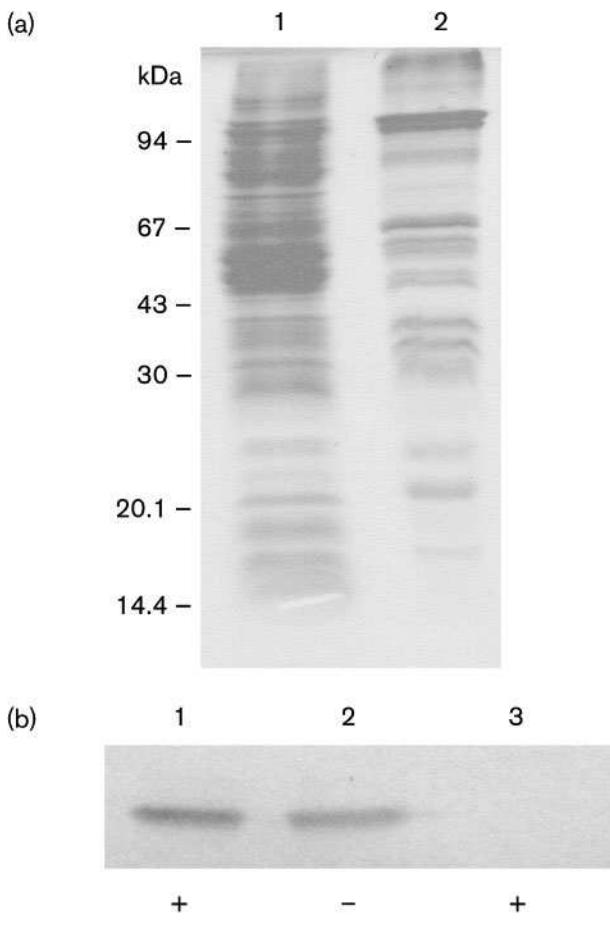
### OMPs preparation

High-quality subcellular fractionation was a prerequisite for a proteomic analysis of the OM subproteome. First, we tried to isolate OMs from the whole-cell envelope of *F. psychrophilum* JIP02/86 using discontinuous sucrose gradient ultracentrifugation. This method was not fruitful, since only one layer containing the envelope material was seen in the gradient, even when the gradient curves were modified (data not shown). Consequently, the ionic detergent Sarkosyl was used on an *F. psychrophilum* cell-envelope suspension (Fig. 1) because of its capability to selectively release proteins from the inner membrane of ruptured Gram-negative bacteria while conserving the integrity of the OM. The purity of the OM preparation (Fig. 1a; lane 2) was shown by immunoblot analysis using antibodies directed against an OM-specific marker (OmpA; Dumetz *et al.*, 2007) and by an enzymic assay using NADH dehydrogenase activity as an inner-membrane marker (Fig. 1b). The signal for OmpA could only be seen in the OM preparation, whereas NADH dehydrogenase activity could only be detected in the Sarkosyl-soluble fraction. This isolation method results in a sufficiently pure OM fraction since no NADH dehydrogenase activity was recorded, underlining the absence of cytoplasmic membrane contaminants.

### 2-D electrophoresis of *F. psychrophilum* OMPs and protein assignment

OMs prepared by Sarkosyl insolubility were used for concise 2-D mapping of *F. psychrophilum* JIP02/86 OMPs (Fig. 2a). Using the non-ionic detergent ASB-14, proteins were solubilized and resolved within a non-linear pH range of 3–10. A total of 34 OMP spots were selected from the 2-D gel. LC-MS/MS analysis of these spots allowed the identification of 36 ORFs comprising 1.5% of the 2432 predicted protein-encoding genes in *F. psychrophilum* (Table 1). All of the detected spots were resolved within a molecular mass range of <120 to about 18 kDa.

Identified proteins were analysed for hydrophobicity by determining their GRAVY scores. A calculated GRAVY score of up to -0.4 indicates a hydrophobic protein,



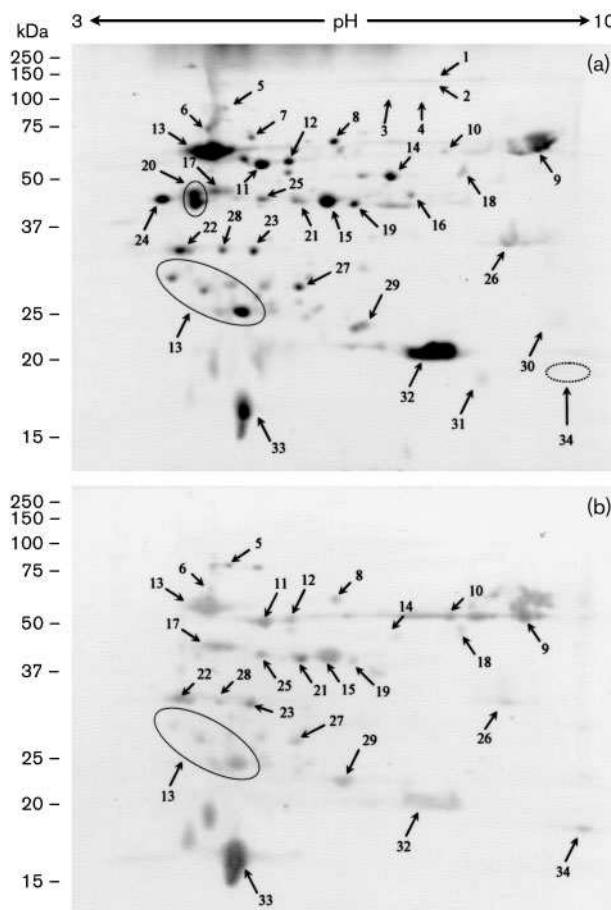
**Fig. 1.** SDS-PAGE analysis of *F. psychrophilum* JIP02/86 proteins. Lanes: 1 (a, b), cell-envelope fraction (20 µg protein); 2 (a, b), Sarkosyl-insoluble OM fraction (10 µg protein); 3 (b), Sarkosyl-soluble inner-membrane fraction (10 µg protein). All samples were solubilized with 1% SDS. Proteins were silver-stained (a) or probed with a rabbit antiserum directed against OmpA (b). NADH dehydrogenase activity in each fraction is indicated by + or - under each in (b).

suggesting a membrane association. Here, such a criterion revealed that 75 % of the proteins identified in the course of the 2-D analysis should be considered to be hydrophobic (Table 1). It should be stressed that even with a score of  $<-0.4$ , a protein might still be membrane-associated as has been shown for some lipoproteins; such hydrophilic components that carry out functions on the membrane surface are tethered to the plasma membrane via acyl chains (e.g. OspA from *Borrelia burgdorferi*, Bouchon *et al.*, 1997; spiralin from *Spiroplasma melliferum*, Le Hénaff & Fontenelle, 2000). Sixteen of the identified proteins are predicted to be OMs, but the subcellular location could not be determined for the 20 other identified spots. However, the identity of some spots suggests that the OM fraction might have been weakly contaminated by cytoplasmic and/or periplasmic components: a probable cytoplasmic cysteine aminopeptidase (spot 16, FP2369; PepC, the

bacterial homologue of the eukaryotic bleomycin hydrolase; Mistou & Gripon, 1998) and a protein of unknown function (spot 24, FP1439; FkpA/FKBP-type, a possible homologue of an *Escherichia coli* periplasmic chaperone; Saul *et al.*, 2004).

Our earlier observations (Duchaud *et al.*, 2007) suggest that the Sec system is the major route contributing to the export of proteins across the plasma membrane. All identified proteins were predicted to contain typical Sec signal N-termini lacking sequence similarity. Twenty-one out of the 36 identified proteins seem to be synthesized as a proprotein containing a typical signal peptide (about 20 aa) with a cleavage specific for signal peptidase I (SPase I). The 15 other spots are proteins predicted to be processed in the same way as Braun's lipoprotein, the prototype for bacterial lipoproteins (Sankaran *et al.*, 1995), since they contain a putative cleavage site for the prolipoprotein-specific signal peptidase II (globomycin-sensitive SPase II). A few proteins were resolved as multiple spots, as shown in Fig. 2(a) (e.g. spot 13, OmpA, FP0156). This might be due to post-translational modifications. Indeed, such modifications can modify the pI while the apparent molecular masses of the proteins are not affected, since the modifications are mainly on the side chains of the amino acids. Heterogeneous sugar modifications do explain the large multiple spots seen for OmpA since it is a glycoprotein (Merle *et al.*, 2003). Spots assembled into a single circle were also identified as OmpA, although their molecular masses were less than 30 kDa, suggesting possible degradation in the course of sample preparation. Interestingly, a probable lipoprotein precursor of an uncharacterized iron-regulated protein (spot 20, FP1478, IrpA) was found as two spots with a difference in their apparent molecular mass of less than 3 kDa, suggesting its presence in the OM in both unprocessed and processed forms. However, the Sec-independent system must be functional since we have previously identified one possible component of the type 1 secretion system from Sarkosyl-insoluble membrane proteins resolved by 1-D electrophoresis (probable multidrug resistance protein, AcrB/AcrD/AcrF family protein, FP0880; Dumetz, 2006) and the gene encoding a probable OM efflux protein TolC (FP0296) is present in the *F. psychrophilum* genome (Duchaud *et al.*, 2007). In Gram-negative bacteria, TolC efflux has been described as a tripartite pump that consists of the TolC OMP and a specific plasma membrane channel (such as AcrB) connected with a periplasmic protein known as the adaptor (e.g. AcrA) (Fernandez-Recio *et al.*, 2004).

Iron import is often the limiting factor in bacterial growth, largely because of the insolubility of Fe(III), but also because mammals reduce the availability of iron to potential pathogens by the use of very high affinity iron-chelating molecules (lactoferrin, transferrin and haemoglobin) (for a review see Bullen *et al.*, 2005). As a consequence, host-adapted pathogens have evolved means of using these iron-bearing molecules as an iron source, as well as in some cases synthesizing their own chelators



**Fig. 2.** 2-D gel map of *F. psychrophilum* JIP02/86. Proteins were prepared from Sarkosyl-insoluble OM material (see Methods) and resolved using non-linear pH 3–10 IPG and 12% SDS-PAGE. Proteins were stained with Coomassie brilliant blue G-250 (a) or probed with a pool of antisera collected from CWD-convalescent trout (b). Protein spots are annotated according to FPORF (*F. psychrophilum* gene annotation; Duchaud *et al.*, 2007).

(siderophores), which are secreted, trap iron and are then transported back into the cell. Interestingly, we found seven proteins in the OM of *F. psychrophilum* which may be involved in iron acquisition/metabolism. They include a probable OMP belonging to the Omp121 family (FP1199), five probable TonB-dependent OM receptors (FP0144, FP1500, FP2456, FP1922 and FP0521), and iron-regulated protein A (IrpA, FP1478). Genes encoding such components have been identified in bacteria belonging to the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* phylum (e.g. *omp200*, a porin gene complex from *Bacteroides fragilis*, *omp121* and *omp71*; Wexler *et al.*, 2002). Because of the importance of iron to the survival of bacterial pathogens within the host environment, the TonB system has been shown to be essential for virulence in diverse organisms (Beddek *et al.*, 2004; Wyckoff *et al.*, 2006) and components are the main targets of the humoral immune response

(e.g. the siderophore receptor FhuA in *Haemophilus parasuis*; del Río *et al.*, 2006). However, functional studies are needed to assign possible roles of these components to iron acquisition and flavobacterial virulence.

Analysis of the OM proteome indicated four spots that were identified as probable cell-surface proteins containing leucine-rich repeats (Lrr proteins: FP0169, FP0171, FP0172 and FP0175). Leucine-rich repeats consist of 2–45 motifs of 20–30 aa in length (Enkhbayar *et al.*, 2004) and appear to provide a structural framework for the formation of protein–protein interactions (Kobe & Kajava, 2001). Proteins containing Lrr include cell-adhesion molecules, virulence factors and extracellular matrix-binding glycoproteins, involved in a variety of biological processes (signal transduction, cell adhesion, disease resistance, immune response, etc.). The four Lrr proteins identified in *F. psychrophilum* are encoded by four genes belonging to a family of 15 genes (Duchaud *et al.*, 2007). They show similarities with BspA and LrrA from the periodontopathogenic bacteria *Tannerella forsythensis* (Inagaki *et al.*, 2005, 2006) and *Treponema denticola* (Ikegami *et al.*, 2004), respectively. These proteins have been reported to be immunogenic cell-surface determinants that bind strongly to extracellular matrix components and play a role in the attachment to human oral tissue, a property that may be important in the virulence of these organisms.

Several known proteins have been retrieved from the OM preparation. They are OmpH/P18 (FP2098; Massias *et al.*, 2004; Dumetz *et al.*, 2006), OmpA (FP0156; Merle *et al.*, 2003; Dumetz *et al.*, 2007) and flavobacterial-specific protein antigen (FspA) (FP2019; Crump *et al.*, 2005). All of them are probably involved in bacteria–host interactions since they are included in a set of antigenic flavobacterial proteins recognized predominantly by antisera from convalescent fish that were naturally infected. Several other proteins and lipoproteins with unknown functions were found (see Table 1). They include a flavomodulin (FP0097) that could be a member of the thiol-activated cytolysin family of pore-forming toxins (TACYS). Such toxins are involved in the pathogenesis mechanism of a number of Gram-positive species of bacteria, such as suilysin from *Streptococcus suis* (Lun *et al.*, 2003). They may interfere with immune cell function and induce cytokine production (Billington *et al.*, 2000). In *F. psychrophilum*, flavomodulin may be present because of a possible lateral gene transfer event from a Gram-positive bacterium, and it may be related to flavobacterial virulence as has been shown for suilysin (Takamatsu *et al.*, 2002).

### Immunogenic OMPs of *F. psychrophilum*

The OM fraction prepared by Sarkosyl insolubility was used for identification of immunoreactive proteins using a pool of antisera collected from CWD-convalescent trout. A total of 25 immunolabelled protein spots were observed from the immunoblot (Fig. 2b) and they matched the protein spots seen in the preparative 2-D gel (Fig. 2a). No immunoreactive

**Table 1.** Protein identification in the OM of *F. psychrophilum* JIP02/86

Assignment of single spots to the locus tag of the complete *F. psychrophilum* genome. Putative cleavage sites for signal peptides, subcellular location and possible transmembrane helices were predicted using SignalP, PSORTb or ExPASy proteomics tools, respectively.

Spot no	NCBI acc. no	Protein description	Peptide matching	Sequence coverage	pI/molecular mass (kDa)	GRAVY score	Putative cleavage site	Subcellular location	Transmembrane helix
1	FP1199	Probable OMP (Omp121 family)	136/22	25.8	8.94/115.1	-0.285	SpI 22–23	OM	0
2	FP0144	Probable TonB-dependent OM receptor	64/36	51.6	9.04/104.9	-0.431	SpI 18–19	OM	1
3	FP2096	Probable OMP	35/25	35.1	9.13/99.9	-0.437	SpI 21–22	OM	0
4	FP1500	Probable TonB-dependent OM receptor	27/22	37.1	9.21/92.2	-0.556	SpI 19–20	OM	0
5	FP2456	Probable TonB-dependent OM ferrichrome-iron receptor	13/13	21.1	8.98/86.5	-0.290	SpII 19–20	OM	0
–	FP0690	Putative OMP involved in nutrient binding	17/17	29.7	9.22/89.5	-0.368	SpI 21–22	OM	1
6	FP1922	Probable TonB-dependent OM ferrichrome-iron receptor FhuA	19/18	35.7	9.19/83.2	-0.300	SpI 20–21	OM	0
7	FP0521	Probable TonB-dependent OM receptor	22/17	40.4	9.18/66.3	-0.324	SpI 18–19	OM	0
8	FP0110	Probable lipoprotein of unknown function	105/21	46.2	6.35/60.7	-0.225	SpII 21–22	Unknown	0
9	FP1198	Probable lipoprotein of unknown function	105/15	37.8	8.18/58.3	-0.066	SpII 19–20	Unknown	0
10	FP1402	Protein of unknown function	36/16	42.4	9.03/56.4	-0.462	SpI 19–20	OM	0
11	FP1346	Probable lipoprotein of unknown function	166/23	57.9	5.49/54.5	-0.346	SpII 20–21	Unknown	1
12	FP2239	Probable lipoprotein of unknown function	93/10	27.6	5.61/50.4	-0.155	SpII 18–19	Unknown	1
13	FP0156	OMP P60 (OmpA family)	364/32	68.6	4.57/49.4	-0.324	SpI 21–22	OM	0
14	FP0073	Protein of unknown function	15/13	40.2	6.68/46.3	-0.248	SpI 22–23	Unknown	0
15	FP1486	Probable lipoprotein of unknown function	215/19	56.1	5.61/44.7	-0.168	SpII 18–19	Unknown	0
16	FP2369	Bleomycin hydrolase minopeptidase C	68/22	63.8	5.97/44.2	-0.454	SpI 21–22	Unknown	0
17	FP0175	Probable cell-surface protein (Lrr protein)	6/4	14.7	5.26/44.1	+0.321	SpI 16–17	Unknown	1
18	FP2433	Protein of unknown function, putative OMP	17/11	27.0	9.58/43.6	-0.067	SpI 19–20	OM	1
19	FP2425	Probable lipoprotein of unknown function	20/12	42.0	5.70/43.4	-0.480	SpII 17–18	Unknown	0
20	FP1478	Probable lipoprotein IrpA	137/15	49.2	4.88/42.4	-0.132	SpII 18–19	OM	0
21	FP0097	Flavomodulin	27/11	32.2	8.26/42.0	-0.185	SpII 18–19	OM	0
22	FP1456	Probable lipoprotein ('S-layer')	106/10	32.6	5.33/37.8	+0.074	SpII 19–20	Unknown	0
23*	FP0171	Probable cell surface protein (Lrr protein)	17/3	13.8	8.88/30.3	+0.239	SpI 18–19	Unknown	1
–	FP0172	Probable cell-surface protein (Lrr protein)	17/3	11.1	8.04/37.2	+0.305	SpI 18–19	Unknown	1
24	FP1439	Protein of unknown function (FKBP-type)	60/9	28.4	4.73/37.2	-0.506	SpII 19–20	Unknown	0
25	FP0169	Probable cell-surface protein (Lrr protein)	12/3	11.8	7.55/35.3	+0.284	SpI 16–17	Unknown	0
26	FP0261	Protein of unknown function	136/15	54.5	7.82/34.0	-0.323	SpI 19–20	OM	1
27	FP0578	Protein of unknown function	57/9	34.7	6.10/29.4	-0.010	SpII 20–21	Unknown	1
28	FP0451	Protein of unknown function	38/10	28.7	8.69/26.0	-0.593	SpII 18–19	Unknown	0
29	FP2138	Protein of unknown function	6/6	31.6	5.73/26.2	-0.333	SpI 16–17	Unknown	1
30	FP1507	Probable lipoprotein YiaD precursor	12/5	29.4	9.06/23.9	-0.217	SpII 21–22	OM	3
31	FP1493	Protein of unknown function	111/9	65.9	8.61/22.7	-0.015	SpII 19–20	Unknown	0
32	FP2019	Flavobacterial-specific protein antigen FspA	176/12	83.3	9.35/21.3	+0.017	SpI 19–20	Unknown	1
33	FP0139	Protein of unknown function	164/7	32.7	7.87/18.4	+0.027	SpI 18–19	OM	0
34	FP2098	OMP P18 (OmpH family)	35/7	48.8	8.58/18.7	-0.456	SpI 23–24	Unknown	1

\*The peptides identified here did not allow us to differentiate the probable cell-surface proteins FP0171 and FP0172.

spot was observed when a pool of antisera obtained from healthy trout was used to probe the blot (data not shown).

The first group of proteins identified in the study included strong immunogens which have been previously well-characterized in *F. psychrophilum*: (i) FspA, (ii) the OmpA family, and (iii) OmpH/P18 (see above). As expected, these proteins comprise some of the major, abundant protein spots on the 2-D immunoblot. It should be stressed that the protein spot corresponding to OmpH/P18 was very poorly stained with Coomassie brilliant blue R-250 (see circle with dashed line, Fig. 2a), whereas it was visible clearly on the immunoblot (Fig. 2b). As a surface-adsorbed protein (Dumetz *et al.*, 2006), OmpH/P18 should be lost during the Sarkosyl treatment of cell envelopes during preparation of the OM fraction. In Gram-negative bacteria, OmpA is highly abundant in the cell wall and is involved in several functions, including the ability of bacteria to invade host cells (adhesin, invasin), to participate in biofilm formation and to act as both an immune target and an evasin. Many of these properties are related to four short protein loops that emanate from the protein to the outside of the cell (for a review see Smith *et al.*, 2007). Although the N-terminal amino acid sequence of *F. psychrophilum* OmpA shows no similarity with any other OMPs of Gram-negative bacteria outside of the family *Flavobacteriaceae*, we have recently shown that OmpA contains five possible thrombospondin type 3 repeat:OmpA/MotB domains, suggesting that it might be involved in the interaction/adherence of the pathogen with the host cells, as for other members of the OmpA family (Dumetz *et al.*, 2007). In addition, OmpA is one of the immunodominant antigens, and antibodies raised against it are capable of killing flavobacterial cells in the presence of complement. Preliminary data suggest also that vaccine cocktails containing OmpA protect rainbow trout against flavobacteriosis. The surface-localized protein FspA was first identified since it reacts strongly with serum from CWD-convalescent fish (Crump *et al.*, 2005). As for OmpA, FspA was shown to be unique and only homologous to unspecified sequences reported from bacteria belonging to the family *Flavobacteriaceae*. However, weak sequence homologies were found with a 17 kDa OMP from *Yersinia pseudotuberculosis* that mediates adhesion to mammalian cells and contributes to serum resistance (Yang *et al.*, 1996). Taking these data as a whole, proteins from this group appear to be the main immunogens, widely exposed at the cell surface of *F. psychrophilum* and, consequently, are the most promising subunit candidates for vaccine design. However, functional studies are needed to clarify their functions, particularly their interactions with host cells and their capabilities to stimulate the immune system.

The second group consisted mainly of a large set of probable proteins or lipoproteins of unknown function, for which there is no homologous equivalent in micro-organisms outside the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* phylum. However, it contained the four probable cell-surface proteins with leucine-rich repeats

identified above that show similarities to BspA and LrrA proteins from *Tannerella forsythensis* and *Treponema denticola*, respectively. Like BspA and LrrA proteins, we have reported here that Lrr proteins in *F. psychrophilum* are immunogenic cell-surface determinants. They might play an important role in attachment to fish tissues, as do their homologues from periodontopathogens which bind strongly to extracellular matrix components (Sharma *et al.*, 1998; Ikegami *et al.*, 2004). The identification of such components belonging to the second group of immunoreactive proteins provides a set of novel antigens that could be unique to *F. psychrophilum* and a useful reservoir for the design of new vaccines. Biochemical characterization is required to establish the function of FP0139 (corresponding to spot 33; Fig. 2) which seems to be a good antigenic candidate. Indeed, the CWD-convalescent trout antisera contain a high titre of antibodies directed against this protein, as suggested by the intensity of the immunolabelled spot. The question concerning the protective activity of such antibodies remains open.

In conclusion, an objective of proteomic investigation concerning the study of bacterial pathogens is the location of proteins within or near the cell surface. Such proteins are known to have pivotal functions related to adhesion and invasion of host tissues, weakening of the host immune response and acquisition of host metabolites necessary for bacterial survival. Consequently, OMPs are good vaccine candidates, since they are usually abundant proteins and are in direct contact with the host immune system. In this study, we have mapped the OM proteome and identified 25 proteins that can elicit a humoral immune response by rainbow trout. Several of them have been identified previously and used as subunit vaccines for experimental challenge/vaccine assays (e.g. OmpH/P18; Dumetz *et al.*, 2006). More interestingly, this study draws up an inventory of new *F. psychrophilum* immunoreactive proteins that may be used either as single antigens or in combinations of several surface-exposed antigens. Further work is needed to evaluate the capability of these components to induce high titres of protective antibodies and their protection efficacy upon challenge with *F. psychrophilum* in fish.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Anne-Marie Richard from Enitab for excellent technical assistance, Daniel Jacob from INRA, Centre de BioInformatique de Bordeaux, for his help in the analysis of the *F. psychrophilum* complete proteome database, and Scott E. LaPatra, Clear Springs Foods, Inc., Buhl, Idaho, USA, for the generous gift of antisera collected from healthy trout. This work was partly sponsored by grants from the Région Aquitaine, from the Ecole Doctorale Université Victor Segalen Bordeaux 2/Ministère de la Recherche and from the Enita-Bordeaux.

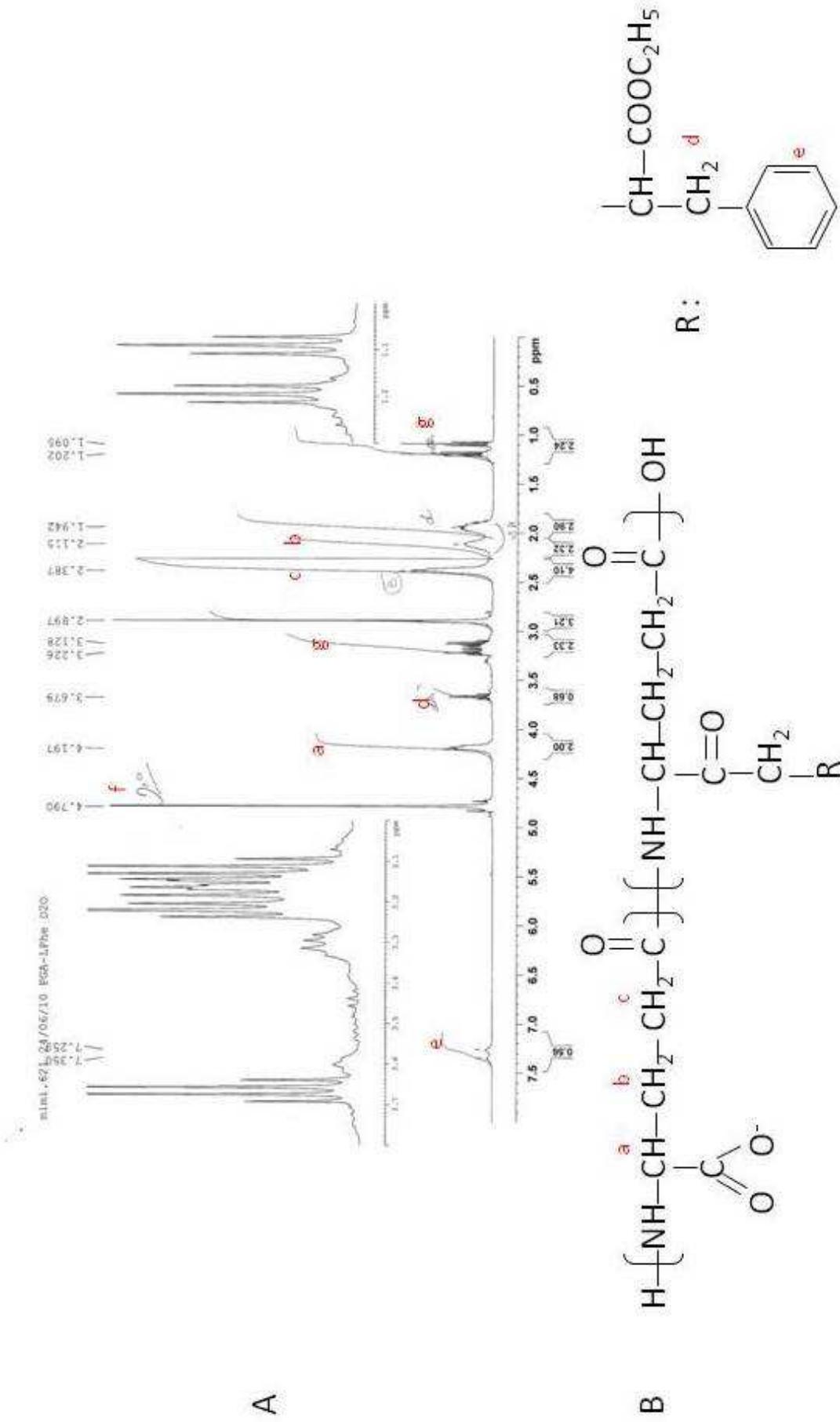
## REFERENCES

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403–410.

- Beddek, A. J., Sheehan, B. J., Bossé, J. T., Rycroft, A. N., Kroll, J. S. & Langford, P. R. (2004).** Two TonB systems in *Actinobacillus pleuropneumoniae*: their roles in iron acquisition and virulence. *Infect Immun* 72, 701–708.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G. & Brunak, S. (2004).** Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340, 783–795.
- Bernardet, J.-F. & Bowman, J. P. (2006).** The genus *Flavobacterium*. In *The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd edn. Edited by M. Dworkin & others. New York: Springer.
- Bertolini, J. M., Wakabayashi, H., Watral, V. G., Whipple, M. J. & Rohvec, 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.
- Billington, S. J., Jost, B. H. & Songer, J. G. (2000).** Thiol-activated cytolsins: structure, function and role in pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett* 182, 197–205.
- Borg, A. F. (1960).** *Studies on Myxobacteria Associated with Diseases in Salmonid Fishes*. Wildlife Disease No. 8. Washington, DC: American Association for the Advancement of Science.
- Bouchon, B., Klein, M., Bischoff, R., Van Dorsselaer, A. & Roitsch, C. (1997).** Analysis of the lipidated recombinant outer surface protein A from *Borrelia burgdorferi* by mass spectrometry. *Anal Biochem* 246, 52–61.
- Boyce, J. D., Cullen, P. A., Nguyen, V., Wilkie, I. & Adler, B. (2006).** Analysis of the *Pasteurella multocida* outer membrane sub-proteome and its response to the *in vivo* environment of the natural host. *Proteomics* 6, 870–880.
- Bullen, J. J., Rogers, H. J., Spalding, P. B. & Ward, C. G. (2005).** Iron and infection: the heart of the matter. *FEMS Immunol Med Microbiol* 43, 325–330.
- 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.
- Crump, E. M., Burian, J., Allen, P. D. & Kay, W. W. (2005).** Identification and expression of a host-recognized antigen, FspA, from *Flavobacterium psychrophilum*. *Microbiology* 151, 3127–3135.
- Crump, E. M., Burian, J., Allen, P. D., Gale, S. & Kay, W. W. (2007).** Identification of a ribosomal L10-like protein from *Flavobacterium psychrophilum* as a recombinant vaccine candidate for rainbow trout fry syndrome. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13, 55–64.
- Dalsgaard, I. (1993).** Virulence mechanisms in *Cytophaga psychrophila* and other *Cytophaga*-like bacteria pathogenic for fish. In *Annual Review of Fish Diseases*, pp. 127–144. Edited by M. Faisal & F. M. Hetrick. New York, NY: Pergamon Press.
- del Rio, M. L., Navas, J., Martín, A. J., Gutiérrez, C. B., Rodríguez-Barbosa, J. I. & Rodríguez Ferri, E. F. (2006).** Molecular characterization of *Haemophilus parasuis* ferric hydroxamate uptake (*fhu*) genes and constitutive expression of the *FhuA* receptor. *Vet Res* 37, 49–59.
- Duchaud, E., Boussaha, M., Loux, V., Bernardet, J.-F., Michel, C., Kerouault, B., Mondot, S., Nicolas, P., Bossy, R. & other authors (2007).** Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Nat Biotechnol* 25, 763–769.
- Dumetz, F. (2006).** *Les antigènes de surface de Flavobacterium psychrophilum: approche protéomique et caractérisation de deux protéines (OmpA/P60 et OmpH/P18) immunoprotectrices*. PhD thesis. University Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, France.
- Dumetz, F., Duchaud, E., LaPatra, S.-E., Le Marrec, C., Claverol, S., Urdaci, M. C. & Le Hénaff, M. (2006).** A protective immune response is generated in rainbow trout by an OmpH-like surface antigen (P18) of *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl Environ Microbiol* 72, 4845–4852.
- Dumetz, F., LaPatra, S.-E., Duchaud, E., Claverol, S. & Le Hénaff, M. (2007).** The *Flavobacterium psychrophilum* OmpA, an outer membrane glycoprotein, induces a humoral response in rainbow trout. *J Appl Microbiol* 103, 1461–1470.
- Enkhbayar, P., Kamiya, M., Osaki, M., Matsumoto, T. & Matsushima, N. (2004).** Structural principles of leucine-rich repeat (LRR) proteins. *Proteins* 54, 394–403.
- Fernandez-Recio, J., Walas, F., Federici, L., Venkatesh Pratap, J., Bavro, V. N., Miguel, R. N., Mizuguchi, K. & Luisi, B. (2004).** A model of a transmembrane drug-efflux pump from Gram-negative bacteria. *FEBS Lett* 578, 5–9.
- Finn, R. D., Mistry, J., Schuster-Böckler, B., Griffiths-Jones, S., Hollich, V., Lassmann, T., Moxon, S., Marshall, M., Khanna, A. & other authors (2006).** Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res* 34, D247–D251.
- Fraser, M. E., James, M. N., Bridger, W. A. & Wolodko, W. T. (1999).** A detailed structural description of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase. *J Mol Biol* 285, 1633–1653.
- Gardy, J. L., Laird, M. R., Chen, F., Rey, S., Walsh, C. J., Ester, M. & Brinkman, F. S. (2005).** PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. *Bioinformatics* 21, 617–623.
- Hofmann, K. & Stoffel, W. (1993).** TMbase – a database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem Hoppe Seyler* 374, 166.
- Iida, Y. & Mizokami, A. (1996).** Outbreaks of coldwater disease in wild ayu and pale chub. *Fish Pathol* 31, 157–164.
- Ikegami, A., Honma, K., Sharma, A. & Kuramitsu, H. K. (2004).** Multiple functions of the leucine-rich repeat protein LrrA of *Treponema denticola*. *Infect Immun* 72, 4619–4627.
- Inagaki, S., Kuramitsu, H. K. & Sharma, A. (2005).** Contact-dependent regulation of a *Tannerella forsythia* virulence factor, BspA, in biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 249, 291–296.
- Inagaki, S., Onishi, S., Kuramitsu, H. K. & Sharma, A. (2006).** *Porphyromonas gingivalis* vesicles enhance attachment, and the leucine-rich repeat BspA protein is required for invasion of epithelial cells by *Tannerella forsythia*. *Infect Immun* 74, 5023–5028.
- Juncker, A. S., Willenbrock, H., Von Heijne, G., Brunak, S., Nielsen, H. & Krogh, A. (2003).** Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci* 12, 1652–1662.
- Kasahara, M. & Anraku, Y. (1974).** Succinate- and NADH oxidase system in *Escherichia coli* membrane vesicles. *J Biochem* 76, 967–976.
- Kobe, B. & Kajava, A. V. (2001).** The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 11, 725–732.
- Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982).** A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* 157, 105–132.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Le Hénaff, M. & Fontenelle, C. (2000).** Chemical analysis of processing of spiralin, the major lipoprotein of *Spiroplasma melliferum*. *Arch Microbiol* 173, 339–345.
- Lun, S., Perez-Casal, J., Connor, W. & Willson, P. J. (2003).** Role of suilysin in pathogenesis of *Streptococcus suis* capsular serotype 2. *Microb Pathog* 34, 27–37.
- MacLean, L. L., Vinogradov, E., Crump, E. M., Perry, M. B. & Kay, W. W. (2001).** The structure of the lipopolysaccharide O-antigen produced by *Flavobacterium psychrophilum* (259–93). *Eur J Biochem* 268, 2710–2716.

- Massias, B., Dumetz, F., Urdaci, M. C. & Le Hénaff, M. (2004).** Identification of P18, a surface protein produced by the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *J Appl Microbiol* **97**, 574–580.
- Merle, C., Faure, D., Urdaci, M. C. & Le Hénaff, M. (2003).** Purification and characterization of a membrane glycoprotein from the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *J Appl Microbiol* **94**, 1120–1127.
- Mistou, M. Y. & Gripon, J. C. (1998).** Catalytic properties of the cysteine aminopeptidase PepC, a bacterial bleomycin hydrolase. *Biochim Biophys Acta* **1383**, 63–70.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. & von Heijne, G. (1997).** Identification of prokaryotic and eucaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**, 1–6.
- Osborn, M. J. & Munson, R. (1974).** Separation of the inner (cytoplasmic) and outer membranes of Gram-negative bacteria. *Methods Enzymol* **31**, 642–653.
- Pearson, W. R. (1990).** Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol* **183**, 63–98.
- Rahman, H., Kuroda, A., Dijkstra, J. M., Kiryu, I., Nakanishi, T. & Otake, M. (2002).** The outer membrane fraction of *Flavobacterium psychrophilum* induces protective immunity in rainbow trout and ayu. *Fish Shellfish Immunol* **12**, 169–179.
- Rhomberg, T. A., Karlberg, O., Mini, T., Zimny-Arndt, U., Wickenberg, U., Röttgen, M., Jungblut, P. R., Jenö, P., Andersson, S. G. & Dehio, C. (2004).** Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of the bacterial pathogen *Bartonella henselae*. *Proteomics* **4**, 3021–3033.
- Sankaran, K., Gupta, S. D. & Wu, H. C. (1995).** Modification of bacterial lipoproteins. *Methods Enzymol* **250**, 683–697.
- Santoni, V., Molloy, M. & Rabilloud, T. (2000).** Membrane proteomics: use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties. *Electrophoresis* **21**, 1054–1070.
- Saul, F. A., Arié, J. P., Vulliez-le Normand, B., Kahn, R., Betton, J. M. & Bentley, G. A. (2004).** Structural and functional studies of FkpA from *Escherichia coli*, a *cis/trans* peptidyl-prolyl isomerase with chaperone activity. *J Mol Biol* **335**, 595–608.
- Schäffer, A. A., Aravind, L., Madden, T. L., Shavirin, S., Spouge, J. L., Wolf, Y. I., Koonin, E. V. & Altschul, S. F. (2001).** Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Res* **29**, 2994–3005.
- Secades, P., Alvarez, B. & Guijarro, J. A. (2001).** Purification and characterization of a psychrophilic, calcium-induced, growth-phase-dependent metalloprotease from the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2436–2444.
- Secades, P., Alvarez, B. & Guijarro, J. A. (2003).** Purification and properties of a new psychrophilic metalloprotease (Fpp2) in the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *FEMS Microbiol Lett* **226**, 273–279.
- Sharma, A., Sojar, H. T., Glurich, I., Honma, K., Kuramitsu, H. K. & Genco, R. J. (1998).** Cloning, expression, and sequencing of a cell surface antigen containing a leucine-rich repeat motif from *Bacteroides forsythus* ATCC 43037. *Infect Immun* **66**, 5703–5710.
- Smith, S. G., Mahon, V., Lambert, M. A. & Fagan, R. P. (2007).** A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiol Lett* **273**, 1–11.
- Sudheesh, P. S., LaFrentz, B. R., Call, D. R., Siems, W. F., LaPatra, S.-E., Wiens, G. D. & Cain, K. D. (2007).** Identification of potential vaccine target antigens by immunoproteomic analysis of a virulent and a non-virulent strain of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Dis Aquat Organ* **74**, 37–47.
- Takamatsu, D., Osaki, M. & Sekizaki, T. (2002).** Evidence for lateral transfer of the sulysin gene region of *Streptococcus suis*. *J Bacteriol* **184**, 2050–2057.
- Wexler, H. M., Read, E. K. & Tomzynski, T. J. (2002).** Characterization of *omp200*, a porin gene complex from *Bacteroides fragilis*: *omp121* and *omp71*, gene sequence, deduced amino acid sequences and predictions of porin structure. *Gene* **283**, 95–105.
- Wyckoff, E. E., Mey, A. R., Leimbach, A., Fisher, C. F. & Payne, S. M. (2006).** Characterization of ferric and ferrous iron transport systems in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **188**, 6515–6523.
- Yang, Y., Merriam, J. J., Mueller, J. P. & Isberg, R. R. (1996).** The *psa* locus is responsible for thermoinducible binding of *Yersinia pseudotuberculosis* to cultured cells. *Infect Immun* **64**, 2483–2489.

Edited by: David M. Gordon



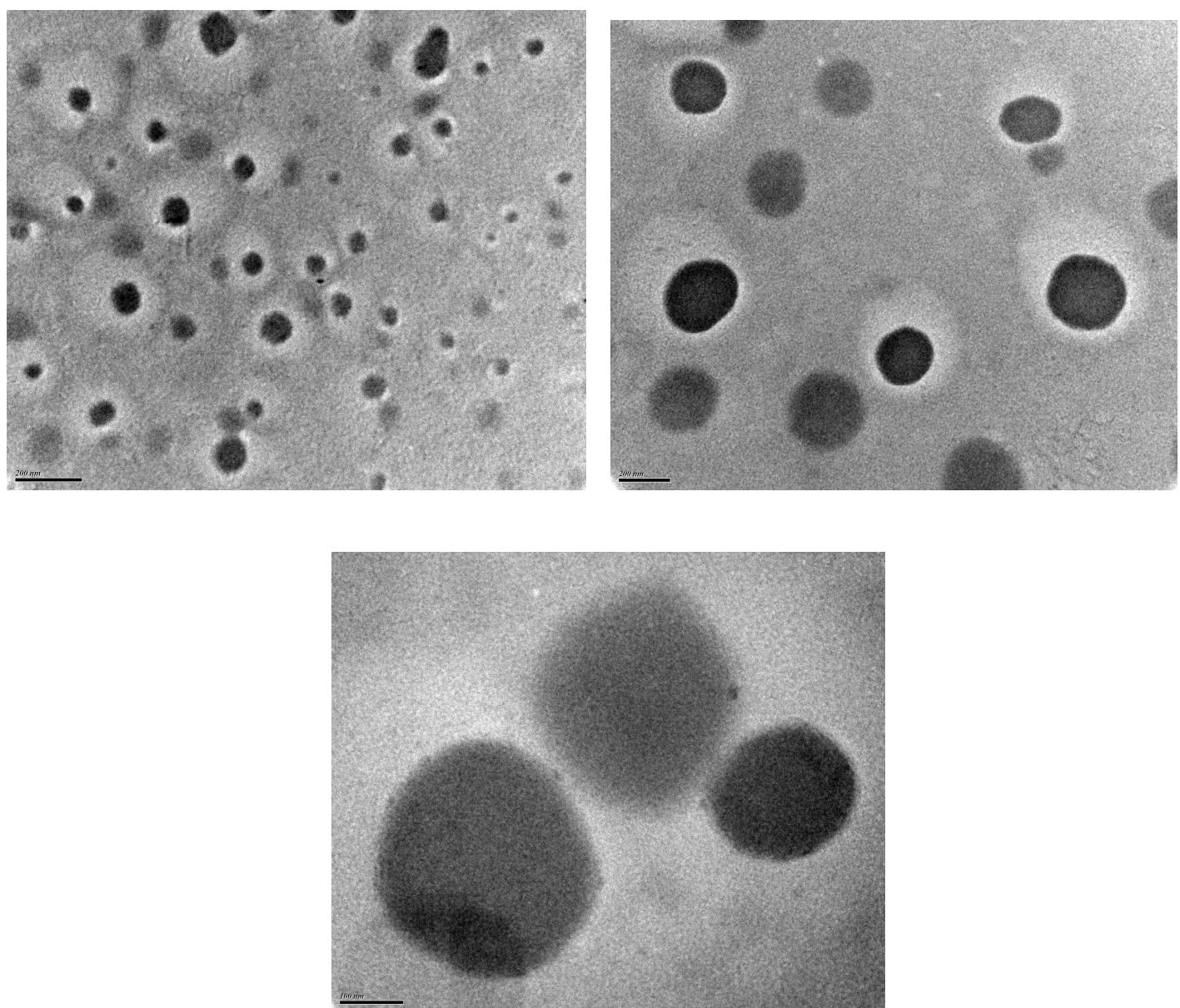
**Fig 22.** H-RMN du macro co-polymère de  $\gamma$ -PGA-L-PHE. A : profil RMN. B : formule développée du co-polymère attendu. R : radical correspondant à la phénylalanine greffée à l'acide  $\gamma$  glutamique. f : solvant eau lourde pour la RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ). g : différents atomes d'hydrogène de l'éthanol (traces de solvant ayant servi pour faire les étapes de lavage).

## 5.2 Approche de la vaccination orale, synthèse de nano-encapsulations organiques

### 5.2.1 Introduction

Un certain nombre d'antigènes, immunoréactifs chez la truite arc-en-ciel, ont été identifiés dans la membrane externe de *F. psychrophilum* (chap 5.1). Il s'agit maintenant de savoir si un cocktail vaccinant constitué de ces molécules est protecteur vis-à-vis de la maladie et d'en trouver une voie d'administration. Classiquement, c'est l'injection (avec ou sans adjuvant) qui est réalisée en pisciculture sur les géniteurs. Ces poissons ne sont pas commercialisés et sont en nombre restreint sur les sites d'élevage (environ un centaine d'individus). Mais, c'est à un stade juvénile qu'il est intéressant de vacciner contre le RTFS alors que la vaccination par injection est difficile à mettre en œuvre sur les truitelles, élevées dans des bassins où elles peuvent être plus de 30 000. La vaccination par balnéation est pratiquée en pisciculture mais la protection obtenue est faible et peu durable (Raïda and Buchmann 2008). Après recueil de quelques témoignages de pisciculteurs, ils apparaissent être relativement peu convaincus par cette méthode. Ainsi nous avons pensé à la voie orale qui est étudiée chez les mammifères. La vaccination par la voie orale nécessite l'utilisation d'un vecteur protégeant les antigènes des sucs gastriques tout en permettant leur accès aux cellules du système immunitaire. Une des pistes de recherche les plus séduisante est l'utilisation de micro-encapsulations protéiques (Des Rieux *et al.* 2006). Cette technique est basée sur la construction de macro-polymères de 2 ou plus d'acides aminés. Les nanoparticules polymériques sont privilégiées car elles sont stables et certaines sont résistantes aux enzymes digestives. De plus, l'utilisation de polymères variés permet de moduler : (1) certaines caractéristiques physicochimiques (hydrophobicité, potentiel zéta), (2) les propriétés de libération des antigènes (zone de libération, retardée, prolongée), et (3) les interactions physiologiques (ciblage, bioadhésion, séquestration cellulaire) des nanoparticules (Galindo-Rodriguez *et al.* 2005). Leurs propriétés de surface permettent aussi de cibler les cellules de l'intestin et d'être absorbé par endocytose ou pinocytose (Mathiowitz *et al.* 1997; Tobio *et al.* 1998). Il existe entre autres des microencapsulations de polymères naturels comme le chitosan, les alginates, le collagène, la gélatine ou de synthèse comme le poly(acide lactique), le poly(acide co-lactique-glycolique), le poly( $\epsilon$ -coprolactone). Il a entre autres été

montré que des nanoparticules renfermant de l'ovalbumine pouvaient délivrer des antigènes aux cellules présentatrices d'antigènes (APCs) et induire une activation des lymphocytes T



**Fig 23.** Images de nanoparticules de  $\gamma$ -PGA-L-PHE prises au microscope électronique à transmission à différents niveaux de grossissement.

## 5. Travail préliminaire sur les mesures prophylactiques

chez la souris (Yoshikawa *et al.* 2008). Également, celles renfermant la protéine du virus du sida (HIV)-1 gp120 induisaient la différenciation des cellules dendritiques humaines en culture (Akagi *et al.* 2007). Dans le cadre de cette étude nous avons tenté de réaliser des nanoparticules de poly(acide  $\gamma$ -glutamique) greffées par la phénylalanine ( $\gamma$ -PGA-L-PHE) (Matsusaki *et al.* 2004).

### 5.2.2 Résultats

#### Analyse du copolymère $\gamma$ -PGA-L-PHE par H-RMN

Le copolymère d'acide  $\gamma$ -glutamique et de L-phénylalanine a été synthétisé par mélange des deux acides aminés en présence d'un catalyseur. Le produit a ensuite été dialysé pour éliminer les résidus non greffés puis lavé à l'éthanol extensivement. La présence du copolymère final est vérifiée par RMN du proton (H-RMN) (**Fig. 22**). La présence dans le spectre des atomes d'hydrogène de l'acide  $\gamma$ -glutamique (a, b et c) ainsi que ceux de la phénylalanine (d et e) confirme que le copolymère  $\gamma$ -PGA-L-PHE est bien synthétisé.

#### Synthèse des nanoparticules vides

Les nanoparticules sont obtenues par dissolution de copolymère  $\gamma$ -PGA-L-PHE dans du DMSO puis par un ajout d'une solution de NaCl à 0,3 M (v/v). Les nanoparticules sont ensuite récupérées par centrifugation, lavées puis conservées dans du PBS. Afin de vérifier qu'elles se sont bien formées, des clichés de microscopie électronique à transmission ont été réalisés (**Fig. 23**). Nous observons clairement la présence de particules sphériques dont le diamètre est compris entre 100 et 200 nm.

### 5.2.3 Perspectives

Par la suite, il conviendra de tenter d'encapsuler des antigènes dans ces nanoparticules. Nous pourrons, entre autres, essayer d'insérer des préparations de lysat cellulaire, d'enveloppe ou de membranes externes de *F. psychrophilum*. D'autres synthèses de nanoparticules organiques seront aussi réalisées comme celles faites à partir de chitosan. Après un travail d'optimisation de l'incorporation du vaccin à la nourriture, une étape de test sur le poisson en partenariat avec des pisciculteurs est à envisager pour vérifier la protection



## *5. Travail préliminaire sur les mesures prophylactiques*

de juvéniles de truite arc-en-ciel conférée contre la flavobactéries. Il sera alors possible de mesurer la production d'anticorps, la présence de la bactérie sur et dans les poissons au cours du traitement, l'induction de gènes de l'immunité, de marquer les encapsulations avec un fluorophore pour identifier leur cellules cibles par microscopie et enfin de mesurer le taux de mortalité due à la maladie dans les bassins testés.



## **6. Conclusion générale et perspectives de la thèse**



## 6. Conclusion générale et perspectives de la thèse

Au cours de cette thèse, nous avons recueilli une quantité importante de données traitant de la prévalence de *F. psychrophilum* dans l'écosystème aquacole. Ces données étaient nécessaires pour analyser les modalités de la relation hôte-pathogène et afin de proposer d'éventuelles mesures prophylactiques aux pisciculteurs.

Une première étape consistait à évaluer le niveau d'infection à *F. psychrophilum* chez le poisson. Ainsi, une méthode de PCR quantitative (qPCR) a été proposée. Elle permet en moins de trois heures de détecter et de quantifier un nombre de copies du gène codant l'ARNr 16S (ADNr 16S) de la bactérie dans les tissus du poisson. En effet, la séquence d'ADNr 16S apparaît comme une cible de choix pour l'amplification dans la mesure où elle est présente en 6 copies dans le chromosome de *F. psychrophilum* (Duchaud *et al.* 2007) ce qui augmente le seuil de sensibilité lors de la détection. Les alignements de séquences d'ADNr 16S révèlent deux couples d'amorces [Fp\_16S1\_Fw ; Fp\_16Sint1\_Rev] et [16S\_338\_fw ; 16S\_503\_rev] qui permettent respectivement, l'amplification de protéines "spécifique" de *F. psychrophilum* ou "universelle" de la plupart des autres bactéries. Différentes suspensions bactériennes (*F. psychrophilum*, autres flavobactéries, autres pathogènes) ont été testées par PCR quantitative afin de valider la spécificité de la méthode de détection de *F. psychrophilum* mais également de préciser le seuil de détection qui est de 4 copies (1 bactérie) en condition de culture, et 10 copies (2 bactéries) en matrices biologiques. L'analyse des courbes de fusion révèle une grande homogénéité de température de fusion des amplifiats obtenus sur des souches *F. psychrophilum*, avec des valeurs centrées sur une température de  $80,5^{\circ}\text{C} \pm 0,6$ . La situation est totalement différente en présence de brins matrices constitués par les souches bactériennes autres que *F. psychrophilum*. La méthode que nous proposons permet donc de bien discriminer une culture de *F. psychrophilum* d'un échantillon bactérien contaminé à l'état de trace par *F. psychrophilum*. Des tissus (peau, muscle et branchies) de truites arc-en-ciel non malades ont été artificiellement infectés avec une quantité connue de *F. psychrophilum*, afin de s'assurer de la capacité de la méthode proposée à détecter la flavobactérie *in situ*. Aucune différence statistique n'a été trouvée entre la quantité déposée et les concentrations calculées dans les différents tissus de poisson. Cette observation indique sans ambiguïté que la qPCR que nous proposons permet également de détecter quantitativement *F. psychrophilum* à partir des tissus de poissons. Dans la mesure où la lutte contre la flavobactériose repose sur la détection et d'identification de l'agent pathogène, une étude d'applicabilité de la technique proposée, en tests de routine à grande échelle, est programmée avec le laboratoire



## 6. Conclusion générale et perspectives de la thèse

départemental des Landes (40) en charge des diagnostics vétérinaires des piscicultures d'Aquitaine.

L'étude écotoxicologique a montré d'une part que *F. psychrophilum* est une bactérie hyper-sensible au cadmium comparée aux autres bactéries Gram négatives. En effet, sa croissance est diminuée d'un facteur 2 à 0,4 µM de Cd par rapport à la condition contrôle (temps de division de 9,9 heures contre 4,8 heures) et d'un facteur 5 à 1,6 µM de Cd (24,0 heures contre 4,8 heures). D'autre part, nous avons constaté qu'une contamination de truites juvéniles par 1 µg CdCl<sub>2</sub>/L (pendant 2 mois) et une injection de 5 × 10<sup>7</sup> bactéries *F. psychrophilum* par individu (pendant 1 mois) ne provoque aucune mortalité. L'expression génique démontre que le cadmium peut avoir des effets contradictoires sur le système immunitaire du poisson. En effet, dans la rate, organe bioaccumulant peu le cadmium, on observe une synergie du métal et de l'infection pour l'induction du gène pro-inflammatoire *il1-β*. De plus, la rate étant l'organe principal de maturation des cellules productrices d'anticorps, cette synergie se retrouve également au niveau du titre en immunoglobuline anti-*F. psychrophilum* dans le sang des poissons. On note également un effet synergique du double traitement pour le gène *tnf-α* dans le foie, la rate et les branchies, et pour le gène *mt-a* dans les branchies. À l'inverse, dans le rein, les gènes *il1-β* et *tnf-α* sont surexprimés en réponse à chaque traitement appliqué séparément, mais la combinaison de ces deux traitements ne conduit pas à un effet additif. La même remarque vaut dans le cas de l'expression d'*il1-β* dans le foie. La difficulté à reproduire la colonisation après l'infection bactérienne nous a empêché de savoir si une telle contamination aurait perturbée la relation hôte-pathogène dans le milieu aquacole dans le sens d'une aggravation du caractère pathogène de la flavobactéries. Cette déconvenue, bien connue des équipes de recherche étudiant la flavobactéries, démontre que sa pathogénicité découle de facteurs externes qui peuvent agir tant sur la bactérie elle-même que sur la capacité du poisson à lui résister.

Le travail comparatif de la prévalence de la flavobactéries dans 7 sites aquacoles d'Aquitaine démontre que la bactérie est omniprésente et que sa pathogénicité est endiguée par le système immunitaire des poissons en bonne santé apparente. L'expression génique mesurée sur les poissons malades et apparemment sains nous apporte deux informations importantes. Tout d'abord, les gènes *mta* et *il1-β* sont de bons marqueurs de l'inflammation générée par *F. psychrophilum*, dans la mesure où ils sont surexprimés dans les branchies, le foie, le rein et la rate des poissons malades. Ensuite, la répression des gènes *mhc2-β*, *tgf-β*,



## 6. Conclusion générale et perspectives de la thèse

*cd8-α* et *igt* dans la rate des poissons malades montre un effondrement du système immunitaire acquis nous permettant d'émettre l'hypothèse que ce phénomène déclenche l'apparition de la maladie. De plus, les plus forts titres en anticorps ont été détectés dans le sang des poissons apparemment sains. L'apparition des signes cliniques de la maladie chez certains individus pourrait être liée à l'infection de la rate et du rein, provoquant une faille dans le système immunitaire et son effondrement. L'implication de facteurs environnementaux n'est pas à exclure pour expliquer la variabilité du taux de mortalité lié à la flavobactériose dans les différents sites étudiés, et nécessiterait plus d'investigations. Nous avons émis deux hypothèses quant à la relation *Oncorhynchus mykiss-Flavobacterium psychrophilum*. Soit la bactérie se comporte comme une commensale de la truite et profite d'une faiblesse passagère de sa santé immunitaire, soit elle est en état de latence maîtrisée et use les défenses immunitaires qui finissent par céder chez les individus les plus faibles. Dans le cas de la première hypothèse, la bactérie commensale ne cause pas de dommages à son hôte. Dans le cas de la seconde hypothèse, la bactérie exerce une pression de dommages chroniques sur les organes de l'hôte. En raison de l'importance quantitative des flavobactéries trouvées dans certains organes de poissons apparemment sains ( $10^8$  bactéries/g de tissu), la seconde hypothèse apparaît plus vraisemblable car un tel niveau de colonisation provoque nécessairement une ponction de nutriments dans les tissus de l'hôte. Afin de reproduire la maladie en laboratoire, différents composés immunodépresseurs pourraient être testés sur des poissons porteurs mais apparemment sains ; en somme, il s'agirait de jouer sur l'affaiblissement des défenses de l'hôte plutôt que sur l'infection expérimentale par le pathogène classiquement réalisée.

Pour mieux comprendre la pathogénicité de la bactérie, nécessairement complexe compte tenu de son comportement de virulence latente, une analyse du protéome de la membrane externe (Dumetz *et al.*, 2008) couplée à l'annotation du génome séquencé (Duchaud *et al.*, 2007) a été effectuée. En raison de leur localisation, ces protéines sont susceptibles d'interagir avec le système immunitaire de l'hôte et donc de constituer des sous-unités antigéniques entrant dans la préparation d'un vaccin protecteur contre la flavobactériose. De plus, ce compartiment de la bactérie, directement en contact avec le milieu extérieur, peut apporter des informations précieuses sur les mécanismes mis en place par la bactérie lors de la phase d'infection, de colonisation et de virulence.



## 6. Conclusion générale et perspectives de la thèse

Les protéines identifiées au cours de l'analyse protéomique et du séquençage ont été classées en 2 groupes correspondant à leur fonction : 1/ l'adhésion et l'invasion des tissus de l'hôte, 2/ l'acquisition de métabolites de l'hôte nécessaires à la croissance de la bactérie. Concernant l'adhésion et l'invasion des tissus, il s'agit d'hémolysines, de cytolysines et d'une famille de métalloprotéases, dont les enzymes Fpp1 et Fpp2 (Secades *et al.*, 2001; Secades *et al.*, 2003). Au total, 27 autres gènes dont les produits d'expression seraient impliqués dans l'adhésion ont été identifiés. Parmi eux, 15 gènes codent des protéines de surface contenant des motifs répétés riches en leucine. Il est très probable que ces molécules jouent un rôle essentiel dans l'adhésion des flavobactéries aux tissus de l'hôte comme cela a été montré chez les bactéries Gram négatives *Bacteroides forsythus* (Sharma *et al.*, 1998) et *Treponema denticola* (Ikegami *et al.*, 2004). Concernant l'acquisition de métabolites, il a été identifié des molécules qui participeraient à l'acquisition du fer ou qui appartiendraient au système de sécrétion Sec-indépendant. Chez *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, il a été montré que l'intégrité du système AcrAB-TolC est très importante dans le processus de colonisation et d'interaction entre le pathogène et les cellule-cibles de l'hôte infecté (Buckley *et al.*, 2006). En ce qui concerne le fer, les bactéries ont développé des systèmes d'acquisition et de transport dont il a été montré qu'ils constituaient des facteurs de virulence (Ratledge and Dover, 2000). Par exemple, la virulence initiale de *Pseudomonas aeruginosa* est perdue lors d'une injection expérimentale chez la souris de mutants déficients en sidérophore et restaurée lors de l'injection de sidérophores (Meyer *et al.*, 1996). Par ailleurs, il a été montré que le fer pouvait réguler l'expression de certains gènes impliqués dans la virulence comme dans le cas de l'adhésine Iha chez *Escherichia coli* (Johnson *et al.*, 2005).

Étant donné que des quantités conséquentes de flavobactéries peuvent être rencontrées dans la rate et le rein de poissons apparemment sains, il sera intéressant de tester l'expression chez la bactérie de tous ces gènes décrits précédemment, dans ces mêmes organes "sur-colonisés" du poisson. Il s'agit en quelques sortes de mesurer l'expression génique d'un pathogène en cours de colonisation de l'hôte.

Les analyses protéomiques ont aussi été analysées par immuno-marquage à l'aide d'un sérum de truite convalescente. Un premier groupe d'immunogènes majeurs comprend des molécules qui ont précédemment été bien décrites. Il s'agit des protéines FspA, OmpA/P60 et OmpH/P18 déjà décrites (Merle *et al.*, 2003; Crump *et al.*, 2005; Dumetz *et al.*, 2006). Des cocktails constitués d'OmpA/P60 se sont révélés protecteurs lors d'essais de vaccination



## *6. Conclusion générale et perspectives de la thèse*

réalisés sur poisson (Dumetz *et al.*, 2007). Bien qu'il ne soit pas possible d'attribuer de rôles spécifiques à ces composés membranaires dans l'interaction de *F. psychrophilum* avec l'hôte-poisson, ces antigènes de surface présentent les qualités requises pour être retenus lors des essais de formulation de vaccins protecteurs de la flavobactériose chez le poisson. Le second groupe d'immunogènes comprend un nombre important de protéines ou lipoprotéines qui n'ont pas d'homologues chez les bactéries.

La recherche d'un vecteur pour le cocktail vaccinant a donné des résultats préliminaires prometteurs et offre des perspectives intéressantes. Des nanoparticules d'environ 100 à 200 nm de diamètre ont été synthétisées. Il conviendra par la suite de tenter d'encapsuler des antigènes (lysat cellulaire, fractions d'enveloppes) de *F. psychrophilum* dans ces nanoparticules. D'autres synthèses de nanoparticules organiques pourront aussi être tentées comme celles faites à partir de chitosan avant de faire des essais de vaccination de poissons sur site aquacole victime de flavobactérioses récurrentes.



## **7. Bibliographie**

- Achard-Joris, M., J. L. Moreau, M. Lucas, M. Baudrimont, N. Mesmer-Dudons, P. Gonzalez, A. Boudou and J. P. Bourdineaud** (2007). Role of metallothioneins in superoxide radical generation during copper redox cycling: defining the fundamental function of metallothioneins. *Biochimie* **89**(12): 1474-88.
- Achard, M., M. Baudrimont, A. Boudou and J. P. Bourdineaud** (2004). Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquat. Toxicol.* **67**(4): 347-57.
- Agarwal, S., D. W. Hunnicutt and M. J. McBride** (1997). Cloning and characterization of the *Flavobacterium johnsoniae* (*Cytophaga johnsonae*) gliding motility gene, gldA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**(22): 12139-44.
- Akagi, T., X. Wang, T. Uto, M. Baba and M. Akashi** (2007). Protein direct delivery to dendritic cells using nanoparticles based on amphiphilic poly(amino acid) derivatives. *Biomaterials* **28**(23): 3427-36.
- Alvarez, B., J. Alvarez, A. Menendez and J. A. Guijarro** (2008). A mutant in one of two exbD loci of a TonB system in *Flavobacterium psychrophilum* shows attenuated virulence and confers protection against cold water disease. *Microbiology* **154**(Pt 4): 1144-51.
- Alvarez, B., P. Secades, M. Prieto, M. J. McBride and J. A. Guijarro** (2006). A mutation in *Flavobacterium psychrophilum* tlpB inhibits gliding motility and induces biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(6): 4044-53.
- Amita, K., M. Hoshimo, T. Honma and H. Wakabayashi** (2000). An investigation on distribution of *Flavobacterium psychrophilum* in the Umikawa River. *Fish. Pathol.* **35**: 193-197.
- Amos, K.** (1985). Procedures for detection and identification of certain fish pathogens. 3<sup>rd</sup> ed. Fish Health Section, American Fishery Society, Corvallis, Oregon.
- Anacker, R. L. and E. J. Ordal** (1955). Study of a bacteriophage infecting the myxobacterium *Chondrococcus columnaris*. *J. Bacteriol.* **70**: 738-741.
- Andersson, E., B. Peixoto, V. Tormanen and T. Matsunaga** (1995). Evolution of the immunoglobulin M constant region genes of salmonid fish, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): implications concerning divergence time of species. *Immunogenetics* **41**(5): 312-5.
- Andres, S., F. Ribeyre, J. N. Tourenq and A. Boudou** (2000). Interspecific comparison of cadmium and zinc contamination in the organs of four fish species along a polymetallic pollution gradient (Lot River, France). *Sci. Total. Environ.* **248**(1): 11-25.
- Atienzar, F. A., Z. Billinghamst and M. H. Depledge** (2002). 4-n-Nonylphenol and 17-beta estradiol may induce common DNA effects in developing barnacle larvae. *Environ. Pollut.* **120**(3): 735-8.
- Atienzar, F. A., B. Cordi, M. E. Donkin, A. J. Evenden, A. N. Jha and M. H. Depledge** (2000). Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palmaria palmata*. *Aquat. Toxicol.* **50**(1-2): 1-12.
- Audry, S., G. Blanc and J. Schafer** (2004). Cadmium transport in the Lot-Garonne River system (France) - temporal variability and a model for flux estimation. *Sci. Total. Environ.* **319**(1-3): 197-213.
- Bader, J. A. and E. B. Shotts** (1998). Identification of *Flavobacterium* and *Flexibacter* species by species-specific polymerase chain reaction primers to the 16S ribosomal RNA gene. *J. Aquat. Anim. Health.* **10**: 311-319.

- Baerwald, M. R., A. B. Welsh, R. P. Hedrick and B. May** (2008). Discovery of genes implicated in whirling disease infection and resistance in rainbow trout using genome-wide expression profiling. *BMC Genomics* **9**: 37.
- Bagchi, D., S. S. Joshi, M. Bagchi, J. Balmoori, E. J. Benner, C. A. Kuszynski and S. J. Stohs** (2000). Cadmium- and chromium-induced oxidative stress, DNA damage, and apoptotic cell death in cultured human chronic myelogenous leukemic K562 cells, promyelocytic leukemic HL-60 cells, and normal human peripheral blood mononuclear cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **14**(1): 33-41.
- Baliarda, A., D. Faure and M. C. Urdaci** (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**(3): 510-6.
- Barillet, S., A. Buet, C. Adam and A. Devaux** (2005). Does uranium exposure induce genotoxicity in the teleostean *Danio rerio*? First experimental results. *Radioprotection Suppl. 1* **40**: S175-S181.
- Baudin-Laurencin, F., J. C. Castric, M. Vigneulle and G. Tixerant** (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*. *Bulletin Académie Vétérinaire de France* **62**: 147-157.
- Beaman, J. R., R. Finch, H. Gardner, F. Hoffmann, A. Rosencrance and J. T. Zelikoff** (1999). Mammalian immunoassays for predicting the toxicity of malathion in a laboratory fish model. *J. Toxicol. Environ. Health. A.* **56**(8): 523-42.
- Behnke, R. J.** (1966). Relationships of the Far Eastern Trout, *Salmo mykiss* walbaum Copeia. *1966*(2): 346-348.
- Bendtsen, J. D., H. Nielsen, G. von Heijne and S. Brunak** (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **340**(4): 783-95.
- Bergey, D. H., F. C. Harrisson, R. S. Breed, B. W. Hammer and F. M. Huntoon** (1923). Bergey's manual of determinative bacteriology, 1st ed.
- Bernardet, J.-F., F. Baudin-Laurencin and G. Tixerant** (1988). First identification of *Cytophaga psychrophila* in France. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **8**: 104-105.
- Bernardet, J.-F. and Y. Nakagawa** (2003). An introduction to the family Flavobacteriaceae. in The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. Edn. 3, rel. 3.15.
- Bernardet, J.-F., P. Segers, M. Vancanneyt, F. Berthe, K. Kersters and P. Vandamme** (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. and J. P. Bowman** (2006). The genus *Flavobacterium*. In The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. Edn. 3, rel. 3.20 (eds. Dworkin, M. et al.) (Springer-Verlag, New-York).
- Bernardet, J. F. and P. A. D. Grimont** (1989). Deoxiribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychophilus* sp. nov., nom. rev., and *Flexibacter marinus*. *It. J. Sys. Bacteriol.* **39**: 346-354.
- Bernardet, J. F. and B. Kerouault** (1989). Phenotypic and genomic studies of "Cytophaga psychrophila" isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in France. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(7): 1796-800.

- Bernardet, J. F., Y. Nakagawa and B. Holmes** (2002). Proposed minimal standards for describing new taxa of the family Flavobacteriaceae and emended description of the family. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**(Pt 3): 1049-70.
- Bertin, G. and D. Averbeck** (2006). Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* **88**(11): 1549-59.
- Bertolini, J. M., H. Wakabayashi, V. G. Watral, M. J. Whipple and J. S. Rohvec** (1994). Electrophoretic detection of proteases from selected strains of *Flexibacter psychrophilus* and assessment of their variability. *J. Aquat. Anim. Health* **6**: 224-233.
- Billington, S. J., B. H. Jost and J. G. Songer** (2000). Thiol-activated cytolysins: structure, function and role in pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **182**(2): 197-205.
- Bols, N. C., J. L. Brubacher, R. C. Ganassin and L. E. Lee** (2001). Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev. Comp. Immunol.* **25**(8-9): 853-73.
- Borg, A. F.** (1948). Studies on *myxobacteria* associated with diseases in salmonid fishes. Ph.D. Thesis. University of Washington. Seattle.
- Borg, A. F.** (1960). Studies on *myxobacteria* associated with diseases in salmonid fishes. American Association for the advancement of science, Wildlife Disease, N° 8, Washington, DC.
- Bouchon, B., M. Klein, R. Bischoff, A. Van Dorsselaer and C. Roitsch** (1997). Analysis of the lipidated recombinant outer surface protein A from *Borrelia burgdorferi* by mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **246**(1): 52-61.
- Branson, E.** (1995). Rainbow trout fry syndrome. *Fish vet. J.* **1**: 1-7.
- Braun, T. F. and M. J. McBride** (2005). *Flavobacterium johnsoniae* GldJ is a lipoprotein that is required for gliding motility. *J. Bacteriol.* **187**(8): 2628-37.
- Bromage, E. S., I. M. Kaattari, P. Zwollo and S. L. Kaattari** (2004). Plasmablast and plasma cell production and distribution in trout immune tissues. *J. Immunol.* **173**(12): 7317-23.
- Brunn, M. S., A. S. Schmidt, L. Madsen and I. Dalsgaard** (2000). Antimicrobial resistance patterns in Danish isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. *Aquaculture* **187**: 201-212.
- Bruno, D. W.** (1992). *Cytophaga psychrophila* (=*Flexibacter psychrophilus*) (Borg), histopathology associated with mortalities among farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in the UK. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **12**: 215-216.
- Buckley, A. M., M. A. Webber, S. Cooles, L. P. Randall, R. M. La Ragione, M. J. Woodward and L. J. Piddock** (2006). The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* plays a role in pathogenesis. *Cell Microbiol.* **8**(5): 847-56.
- Bustos, P. A., J. Calbuyahue, J. Montana, B. Opazo, P. Entrala and R. Solervisenc** (1995). First isolation of *Flexibacter psychrophilus*, as causative agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS), producing rainbow trout mortality in Chile. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **15**: 162-164.
- Caipang, C. M., C. C. Lazado, M. F. Brinchmann and V. Kiron** Infection-induced changes in expression of antibacterial and cytokine genes in the gill epithelial cells of Atlantic cod, *Gadus morhua* during incubation with bacterial pathogens. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **156**(4): 319-25.
- Caipang, C. M., C. C. Lazado, M. F. Brinchmann and V. Kiron** (2010). Infection-induced changes in expression of antibacterial and cytokine genes in the gill epithelial cells of Atlantic cod, *Gadus morhua*

- during incubation with bacterial pathogens. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **156**(4): 319-25.
- Cambier, S., P. Gonzalez, G. Durrieu and J. P. Bourdineaud** (2010). Cadmium-induced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **73**(3): 312-9.
- Casadevall, A. and L. A. Pirofski** (1999). Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun.* **67**(8): 3703-13.
- Casadevall, A. and L. A. Pirofski** (2000). Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infect. Immun.* **68**(12): 6511-8.
- Castillo, A., C. Sanchez, J. Dominguez, S. L. Kaattari and A. J. Villena** (1993). Ontogeny of IgM and IgM-bearing cells in rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.* **17**(5): 419-24.
- Cepeda, C. and Y. Santos** (2000). Rapid and low-level toxic PCR-based method for routine identification of *Flavobacterium psychrophilum*. *Int. Microbiol.* **3**(4): 235-8.
- Cipriano, R. C. and R. A. Holt** (2005). *Flavobacterium psychrophilum*, cause of Bacterial Cold-Water Disease and Rainbow Trout Fry Syndrome. *Fish Disease Leaflet No. 86. United States Dept. of the Interior. US. Geological Service, National Fish Health Research Laboratory, Kearneysville.*
- Crump, E. M., J. Burian, P. D. Allen and W. W. Kay** (2005). Identification and expression of a host-recognized antigen, FspA, from *Flavobacterium psychrophilum*. *Microbiology* **151**(Pt 9): 3127-35.
- Crump, E. M., M. B. Perry, S. C. Clouthier and W. W. Kay** (2001). Antigenic characterization of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(2): 750-9.
- Dalsgaard, I.** (1993). Virulence mechanisms in *Cytophaga psychrophila* and other *Cytophaga*-like bacteria pathogenic for fish. *Annual Review of Fish Diseases*: 127-144. Edited by M. Faisal & F. M. Hetrick. New York, NY: Pergamon Press.
- Dalsgaard, I. and L. Madsen** (2000). Bacterial pathogens in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), reared at Danish freshwater farms. *J. Fish. Dis.* **23**(199-209).
- Davis, H. S.** (1946). Care and diseases of trout. United States Fish and Wildlife Service Research Report 12. Washington, DC. p. 98.
- Decostere, A., E. D'Hease, M. Lammens, H. Nelis and F. Haesebrouck** (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.
- Decostere, A., M. Lammens and F. Haesebrouck** (2000). Difficulties in experimental infection studies with *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using immersion, oral and anal challenges. *Res. Vet. Sci.* **69**(2): 165-9.
- Del Cerro, A., I. Marquez and J. A. Guijarro** (2002a). Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(10): 5177-80.
- Del Cerro, A., M. C. Mendoza and J. A. Guijarro** (2002b). Usefulness of a TaqMan-based polymerase chain reaction assay for the detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Appl. Microbiol.* **93**(1): 149-56.
- Del Rio, M. L., J. Navas, A. J. Martin, C. B. Gutierrez, J. I. Rodriguez-Barbosa and E. F. Rodriguez Ferri** (2006). Molecular characterization of *Haemophilus parasuis* ferric hydroxamate uptake (fhu) genes and constitutive expression of the FhuA receptor. *Vet. Res.* **37**(1): 49-59.

## 7. Bibliographie

- Delaleu, N. and M. Bickel** (2004). Interleukin-1 beta and interleukin-18: regulation and activity in local inflammation. *Periodontol 2000* **35**(2): 42-52.
- Des Rieux, A., V. Fievez, M. Garinot, Y. J. Schneider and V. Preat** (2006). Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *J. Control. Release* **116**(1): 1-27.
- Descotes, J.** (1992). Immunotoxicology of cadmium. *IARC Sci. Publ.*(118): 385-90.
- Devaux, A., M. Pesonen and G. Monod** (1997). Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. *Toxicol. In Vitro* **11**(1-2): 71-9.
- Duchaud, E., M. Boussaha, V. Loux, J. F. Bernardet, C. Michel, B. Kerouault, S. Mondot, P. Nicolas, R. Bossy, C. Caron, P. Bessieres, J. F. Gibrat, S. Claverol, F. Dumetz, M. Le Henaff and A. Benmansour** (2007). Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Nat. Biotechnol.* **25**(7): 763-9.
- Dumetz, F., E. Duchaud, S. Claverol, N. Orieux, S. Papillon, D. Lapaillerie and M. Le Henaff** (2008). Analysis of the *Flavobacterium psychrophilum* outer-membrane subproteome and identification of new antigenic targets for vaccine by immunomics. *Microbiology* **154**(Pt 6): 1793-801.
- Dumetz, F., E. Duchaud, S. E. LaPatra, C. Le Marrec, S. Claverol, M. C. Urdaci and M. Le Henaff** (2006). A protective immune response is generated in rainbow trout by an OmpH-like surface antigen (P18) of *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(7): 4845-52.
- Dumetz, F., S. E. Lapatra, E. Duchaud, S. Claverol and M. Le Henaff** (2007). The *Flavobacterium psychrophilum* OmpA, an outer membrane glycoprotein, induces a humoral response in rainbow trout. *J. Appl. Microbiol.* **103**(5): 1461-70.
- ESCOOD** (2002a). (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage). Comparative analysis of baseline 8-oxoguanine in mammalian cell DNA, by different methods in different laboratories; an approach to consensus. *Carcinogenesis* **23**: 2129-2133.
- ESCOOD** (2002b). (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage). Inter-laboratory validation of procedures for measuring 8-oxo-7, 8-dihydroguanine / 8-oxo-7, 8-dihydro-2'deoxyguanosine in DNA. *Free Radic. Res.* **36**: 239-245.
- Evans, D. L., J. H. Leary, 3rd and L. Jaso-Friedmann** (2001). Nonspecific cytotoxic cells and innate immunity: regulation by programmed cell death. *Dev. Comp. Immunol.* **25**(8-9): 791-805.
- Evensen, O. and E. Lorenzen** (1996). An immunohistochemical study of *Flexibacter psychophilus* infection in experimentally and naturally infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Dis. Aquat. Org.* **29**: 227-232.
- Evensen, O. and E. Lorenzen** (1997). Simultaneous demonstration of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and *Flavobacterium psychrophilum* in paraffin-embedded specimens of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Dis. Aquat. Org.* **29**: 227-232.
- FAO** (2008). FishStat plus with Aquaculture production (1950-2008) database.
- Fearon, D. T.** (1997). Seeking wisdom in innate immunity. *Nature* **388**(6640): 323-4.
- Fearon, D. T. and R. M. Locksley** (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* **272**(5258): 50-3.
- Fernandez-Recio, J., F. Walas, L. Federici, J. Venkatesh Pratap, V. N. Bavro, R. N. Miguel, K. Mizuguchi and B. Luisi** (2004). A model of a transmembrane drug-efflux pump from Gram-negative bacteria. *FEBS Lett.* **578**(1-2): 5-9.

- Ferra, C.** (2008). *Aquaculture*. 978-2-7117-71191-2, Vuibert.
- Follett, E. A. and D. M. Webley** (1965). An electron microscope study of the cell surface of *Cytophaga johnsonii* and some observations on related organisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* **31**(4): 361-82.
- Frahm, E. and U. Obst** (2003). Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *J. Microbiol. Methods*. **52**(1): 123-31.
- Froese, R. and D. Pauly** (2006). *Oncorhynchus mykiss*.
- Froystad, M. K., M. Rode, T. Berg and T. Gjoen** (1998). A role for scavenger receptors in phagocytosis of protein-coated particles in rainbow trout head kidney macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* **22**(5-6): 533-49.
- Fujiwara-Nagata, E. and M. Eguchi** (2009). Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Fish. Dis.* **32**(10): 873-81.
- Galindo-Rodriguez, S. A., E. Allemann, H. Fessi and E. Doelker** (2005). Polymeric nanoparticles for oral delivery of drugs and vaccines: a critical evaluation of in vivo studies. *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.* **22**(5): 419-64.
- Gardy, J. L., M. R. Laird, F. Chen, S. Rey, C. J. Walsh, M. Ester and F. S. Brinkman** (2005). PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. *Bioinformatics* **21**(5): 617-23.
- Gherna, R. and C. R. Woese** (1992). A partial phylogenetic analysis of the "flavobacter-bacteroides" phylum: basis for taxonomic restructuring. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**(4): 513-21.
- Giaginis, C., E. Gatzidou and S. Theocharis** (2006). DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **213**(3): 282-90.
- Gonzalez, P., M. Baudrimont, A. Boudou and J. P. Bourdineaud** (2006). Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *Biometals* **19**(3): 225-35.
- Guichard, B.** (2004). Enquête "Pathologie des poissons 2004": résultats & analyse. Agence Francaise de Sécurité Sanitaire des Aliments, Brest, France.
- Hadidi, S., G. W. Glenney, T. J. Welch, J. T. Silverstein and G. D. Wiens** (2008). Spleen size predicts resistance of rainbow trout to *Flavobacterium psychrophilum* challenge. *J. Immunol.* **180**(6): 4156-65.
- Hagger, J. A., F. A. Atienzar and A. N. Jha** (2005). Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc, *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* **74**(3): 205-17.
- Halliwel, B.** (1999). Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat. Res.* **443**(1-2): 37-52.
- Hansen, J. D., E. D. Landis and R. B. Phillips** (2005). Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**(19): 6919-24.
- Harms, C. A., S. Kennedy-Stoskopf, W. A. Horne, F. J. Fuller and W. A. Tompkins** (2000). Cloning and sequencing hybrid striped bass (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*) transforming growth factor-beta (TGF-

- beta), and development of a reverse transcription quantitative competitive polymerase chain reaction (RT-qPCR) assay to measure TGF-beta mRNA of teleost fish. *Fish. Shellfish. Immunol.* **10**(1): 61-85.
- Harms, G., A. C. Layton, H. M. Dionisi, I. R. Gregory, V. M. Garrett, S. A. Hawkins, K. G. Robinson and G. S. Sayler** (2003). Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* **37**(2): 343-51.
- Hibi, K., H. Ushio, H. Fukuda, K. Mitsubayashi, T. Hayashi, H. Ren and H. Endo** (2008). Immunomagnetic separation using carbonyl iron powder and flow cytometry for rapid detection of *Flavobacterium psychrophilum*. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**(4): 1147-52.
- Hill, W. R., A. T. Bednarek and I. L. Larsen** (2000). Cadmium sorption and toxicity in autotrophic biofilms. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* **57**: 530-537.
- Hirsch, P., W. Ludwig, C. Hethke, M. Sittig, B. Hoffmann and C. A. Gallikowski** (1998). Hymenobacter roseosalivarius gen. nov., sp. nov. from continental Antarctica soils and sandstone: bacteria of the *Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides* line of phylogenetic descent. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**: 374-383.
- Holmes, B.** (1992). The genera *Flavobacterium*, *Sphingobacterium* and *Weeksella*, p. 3620-3630. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, 2nd ed., vol. 4. Springer-Verlag, Berlin.
- Holmes, B., R. J. Owen and T. A. McMeekin** (1984). Genus *Flavobacterium* Bergey, Harrisson, Breed, Hammer and Huntoon 1923, 97AL, p.353-361. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Holt, R. A.** (1987). *Cytophaga psychrophila*, the causative agent of bacterial coldwater disease in salmonid fish. Ph.D. Thesis. University State of Oregon. Corvallis.
- Holt, R. A., J. S. Rohovec and J. L. Fryer** (1993). Bacterial Cold Water Disease. In: *Bacterial Diseases of fish* (ed. By V. Inglis, R.J. Roberts and N.R. Bromage), pp.3-23. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Hunnicutt, D. W., M. J. Kempf and M. J. McBride** (2002). Mutations in *Flavobacterium johnsoniae* gldF and gldG disrupt gliding motility and interfere with membrane localization of GldA. *J. Bacteriol.* **184**(9): 2370-8.
- Hunnicutt, D. W. and M. J. McBride** (2000). Cloning and characterization of the *Flavobacterium johnsoniae* gliding-motility genes gldB and gldC. *J. Bacteriol.* **182**(4): 911-8.
- Iida, Y. and A. Mizokami** (1996). Outbreaks of coldwater disease in wild ayu and pale chub. *Fish. Pathol.* **31**: 157-164.
- Ikegami, A., K. Honma, A. Sharma and H. K. Kuramitsu** (2004). Multiple functions of the leucine-rich repeat protein LrrA of *Treponema denticola*. *Infect. Immun.* **72**(8): 4619-27.
- Inagaki, S., H. K. Kuramitsu and A. Sharma** (2005). Contact-dependent regulation of a *Tannerella forsythia* virulence factor, BspA, in biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* **249**(2): 291-6.
- Inagaki, S., S. Onishi, H. K. Kuramitsu and A. Sharma** (2006). *Porphyromonas gingivalis* vesicles enhance attachment, and the leucine-rich repeat BspA protein is required for invasion of epithelial cells by "Tannerella forsythia". *Infect. Immun.* **74**(9): 5023-8.
- Inoue, K., H. Takano, A. Shimada and M. Satoh** (2009). Metallothionein as an anti-inflammatory mediator. *Mediators Inflamm.* **2009**: 101659.

## 7. Bibliographie

- Ivorra, N., C. Barranguet, M. Jonker, M. H. Kraak and W. Admiraal** (2002). Metal-induced tolerance in the freshwater microbenthic diatom *Gomphonema parvulum*. *Environ. Pollut.* **116**(1): 147-57.
- Izumi, S., F. Aranishi and H. Wakabayashi** (2003). Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* using PCR-RFLP analysis. *Dis. Aquat. Organ.* **56**(3): 207-14.
- Izumi, S., H. Fujii and F. Aranishi** (2005). Detection and identification of *Flavobacterium psychrophilum* from gill washings and benthic diatoms by PCR-based sequencing analysis. *J. Fish. Dis.* **28**(9): 559-64.
- Joseph, P.** (2009). Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **238**(3): 272-9.
- Kent, M. L., G. M. Groff, J. K. Morrisson, W. T. Yasutake and R. A. Holt** (1989). Spiral swimming behaviour due to cranial and vertebral lesions associated with *Cytophaga psychrophila* infections in salmonid fishes. *Dis. Aquat. Org.* **6**: 11-16.
- Knight, J. A.** (2000). Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **30**(2): 145-58.
- Kollner, B., U. Blohm, G. Kotterba and U. Fischer** (2001). A monoclonal antibody recognising a surface marker on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocytes. *Fish. Shellfish. Immunol.* **11**(2): 127-42.
- Kollner, B. and G. Kotterba** (2002). Temperature dependent activation of leucocyte populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after intraperitoneal immunisation with *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol.* **12**(1): 35-48.
- Komatsu, K., S. Tsutsui, K. Hino, K. Araki, Y. Yoshiura, A. Yamamoto, O. Nakamura and T. Watanabe** (2009). Expression profiles of cytokines released in intestinal epithelial cells of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in response to bacterial infection. *Dev. Comp. Immunol.* **33**(4): 499-506.
- Kondo, M., K. Kawai, K. Kurohara and S. Oshima** (2002). Adherence of *Flavobacterium psychrophilum* on the body surface of the ayu *Plecoglossus altivelis*. *Microbes Infect.* **4**(3): 279-83.
- Kondo, M., K. Kawai, M. Okabe, N. Nakano and S. Oshima** (2003). Efficacy of oral vaccine against bacterial coldwater disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis. Aquat. Organ.* **55**(3): 261-4.
- Koppang, E. O., M. Lundin, C. M. Press, K. Rønningen and O. Lie** (1998). Differing levels of Mhc class II  $\beta$  chain expression in a range of tissues from vaccinated and non-vaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.* **8**: 183-196.
- LaFrentz, B. R., S. E. LaPatra, G. R. Jones and K. D. Cain** (2004). Protective immunity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* following immunization with distinct molecular mass fractions isolated from *Flavobacterium psychrophilum*. *Dis. Aquat. Organ.* **59**(1): 17-26.
- Le Henaff, M. and C. Fontenelle** (2000). Chemical analysis of processing of spiralin, the major lipoprotein of *Spiroplasma melliferum*. *Arch. Microbiol.* **173**(5-6): 339-45.
- Lehmann, J., D. Mock, F. J. Sturenberg and J. F. Bernardet** (1991). First isolation of *Cytophaga psychrophila* from a systemic disease in eel and cyprinids. *Dis. Aquat. Org.* **10**: 217-220.
- Lindenstrøm, T., C. J. Secombes and K. Buchmann** (2004). Expression of immune response genes in rainbow trout skin induced by *Gyrodactylus derjavini* infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **97**(3-4): 137-48.
- Lindstrom, N. M., D. R. Call, M. L. House, C. M. Moffitt and K. D. Cain** (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**(1): 43-56.

- Lorenzen, E., I. Dalsgaard, J. From, E. M. Hansen, V. Horlyck, H. Korsholm, S. Mellergaard and N. J. Olesen** (1991). Preliminary investigation of fry mortality syndrome in rainbow trout. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **11**: 77-79.
- Lorenzen, E. and N. karas** (1992). Detection of *Flexibacter psychrophilus* by immunofluorescence in fish suffering from mortality syndrome: a rapid diagnostic method. *Dis. Aquat. Org.* **13**: 231-234.
- Lumsden, J. S., V. E. Ostland and H. W. Fergusson** (1996). Necrotic myositis in cage cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), caused by *Flexibacter psychrophilus*. *J. Fish Dis.* **19**: 113-119.
- MacLean, L. L., E. Vinogradov, E. M. Crump, M. B. Perry and W. W. Kay** (2001). The structure of the lipopolysaccharide O-antigen produced by *Flavobacterium psychrophilum* (259-93). *Eur. J. Biochem.* **268**(9): 2710-6.
- Madetoja, J., I. Dalsgaard and T. Wiklund** (2002). Occurrence of *Flavobacterium psychrophilum* in fish-farming environments. *Dis. Aquat. Organ.* **52**(2): 109-18.
- Madetoja, J. and T. Wiklund** (2002). Detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* in water from fish farms. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**(2): 259-66.
- Madsen, L. and I. Dalsgaard** (1998). Characterization of *Flavobacterium psychrophilum*: a comparison of proteolytic activity and virulence of strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In: Barnes, A.C., G.A. Davidson, M.P. Hiney, and D. McIntosh (Eds) *Methodology in Fish Diseases Research*. Fisheries Research Services, Aberdeen, p. 45-52.
- Magnadottir, B., S. Lange, S. Gudmundsdottir, J. Bogwald and R. A. Dalmo** (2005). Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish. Shellfish. Immunol.* **19**(5): 429-39.
- Martinez, J. L., A. Casado and R. Enriquez** (2004). Experimental infection of *Flavobacterium psychrophilum* in fins of Atlantic salmon *Salmo salar* revealed by scanning electron microscopy. *Dis. Aquat. Organ.* **59**(1): 79-84.
- Massias, B., F. Dumetz, M. C. Urdaci and M. Le Henaff** (2004). Identification of P18, a surface protein produced by the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Appl. Microbiol.* **97**(3): 574-80.
- Mata, M. and Y. Santos** (2001). An improved enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from salmon and rainbow trout. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **21**: 195-199.
- Mathiowitz, E., J. S. Jacob, Y. S. Jong, G. P. Carino, D. E. Chickering, P. Chaturvedi, C. A. Santos, K. Vijayaraghavan, S. Montgomery, M. Bassett and C. Morrell** (1997). Biologically erodable microspheres as potential oral drug delivery systems. *Nature* **386**(6623): 410-4.
- Matsusaki, M., K. Hiwatari, M. Higashi, T. Kaneko and M. Akashi** (2004). Stably-dispersed and Surface-functional Bionanoparticles Prepared by Self-assembling Amphipathic Polymers of Hydrophilic Poly( $\gamma$ -glutamic acid) Bearing Hydrophobic Amino Acids. *Chem. Letters* **33**(4): 398-399.
- McBride, M. J.** (2001). Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 49-75.
- McBride, M. J.** (2004). *Cytophaga-flavobacterium* gliding motility. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **7**(1-2): 63-71.
- McBride, M. J., T. F. Braun and J. L. Brust** (2003). *Flavobacterium johnsoniae* GldH is a lipoprotein that is required for gliding motility and chitin utilization. *J. Bacteriol.* **185**(22): 6648-57.

- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr.** (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* **296**(5566): 298-300.
- Merle, C., D. Faure, M. C. Urdaci and M. Le Henaff** (2003). Purification and characterization of a membrane glycoprotein from the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Appl. Microbiol.* **94**(6): 1120-7.
- Miller, N., M. Wilson, E. Bengten, T. Stuge, G. Warr and W. Clem** (1998). Functional and molecular characterization of teleost leukocytes. *Immunol. Rev.* **166**: 187-97.
- Misaka, J., T. Nishizawa and M. Yoshimizu** (2008). Quantitative detection of viable *Flavobacterium psychrophilum* in chum salmon *Oncorhynchus keta* by colony blotting and immunostaining. *Fish. Pathol.* **43**: 117-123.
- Mistou, M. Y. and J. C. Gripon** (1998). Catalytic properties of the cysteine aminopeptidase PepC, a bacterial bleomycin hydrolase. *Biochim. Biophys. Acta* **1383**(1): 63-70.
- Murad, A. and A. H. Houston** (1988). Leukocytes and leukopoietic capacity of goldfish, *Carassius auratus*, exposed to sublethal levels of cadmium. *Aquat. Toxicol.* **13**(2): 141-154.
- Nakagawa, Y. and K. Yamasato** (1993). Phylogenetic diversity of the genus *Cytophaga* revealed by 16S rRNA sequencing and menaquinone analysis. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1155-1161.
- Nakagawa, Y. and K. Yamasato** (1996). Emendation of the genus *Cytophaga* and transfer of *Cytophaga agarovorans* and *Cytophaga salmonicolor* to Marinilabilia gen. Nov.: phylogenetic analysis of the *Flavobacterium-Cytophaga* complex. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**(599-603).
- Nematollahi, A., A. Decostere, F. Pasmans and F. Haesebrouck** (2003). *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. *J. Fish. Dis.* **26**(10): 563-74.
- Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak and G. von Heijne** (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein. Eng.* **10**(1): 1-6.
- Onuk, E. E., A. Ciftci, A. Findik and Y. Durmaz** (2010). Development and evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Flavobacterium psychrophilum*, *Yersinia ruckeri* and *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in culture fisheries. *J. Vet. Sci.* **11**(3): 235-41.
- Ordal, E. J. and R. R. Rucker** (1944). Pathogenic myxobacteria. *Soc. Exp. Biol. Med. Proc.* **56**: 15-18.
- Orieux, N., J. P. Bourdineaud, D. G. Douet, P. Daniel and M. Le Henaff** (2011). Quantification of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) samples by qPCR. *J. Fish. Dis. (Soumis)*.
- Otis, E. J.** (1984). Lesions of cold-water disease in steelhead trout (*Salmo gairdneri*): the role of *Cytophaga psychrophila* extracellular product. Ph.D. University of Rhode Island, Kingston
- Overturf, K. and S. LaPatra** (2006). Quantitative expression (Walbaum) of immunological factors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), after infection with either *Flavobacterium psychrophilum*, *Aeromonas salmonicida*, or infectious haematopoietic necrosis virus. *J. Fish. Dis.* **29**(4): 215-24.
- Prasad, A. S.** (2008). Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. *Exp. Gerontol.* **43**: 370-377.
- Press, M., B. H. Dannevig and T. Landsverk** (1994). Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.* **4**: 79-93.

- Rahman, H., A. Kuroda, J. M. Dijkstra, I. Kiryu, T. Nakanishi and M. Ototake** (2002). The outer membrane fraction of *Flavobacterium psychrophilum* induces protective immunity in rainbow trout and ayu. *Fish Shellfish Immunol.* **12**(2): 169-79.
- Raida, M. K. and K. Buchmann** (2007). Temperature-dependent expression of immune-relevant genes in rainbow trout following *Yersinia ruckeri* vaccination. *Dis. Aquat. Organ.* **77**(1): 41-52.
- Raida, M. K. and K. Buchmann** (2008). Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) against *Yersinia ruckeri*: effects of temperature on protection and gene expression. *Vaccine* **26**(8): 1050-62.
- Raida, M. K. and K. Buchmann** (2009). Innate immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against primary and secondary infections with *Yersinia ruckeri* O1. *Dev. Comp. Immunol.* **33**(1): 35-45.
- Rangdale, R. E. and K. Way** (1995). Rapid identification of *Cytophaga psychrophila* from infected spleen tissue using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **17**: 108-111.
- Reichenbach, H.** (1989). Order I. Cytophagales Leadbetter 1974, 99AL, p. 2011-2013. In J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig, and J. G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 3. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Rhomberg, T. A., O. Karlberg, T. Mini, U. Zimny-Arndt, U. Wickenberg, M. Rottgen, P. R. Jungblut, P. Jeno, S. G. Andersson and C. Dehio** (2004). Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of the bacterial pathogen *Bartonella henselae*. *Proteomics* **4**(10): 3021-33.
- Rozen, S. and H. Skaletsky** (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* **132**: 365-86.
- Russo, C., L. Rocco, M. A. Morescalchi and V. Stingo** (2004). Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **57**(2): 168-74.
- Sankaran, K., S. D. Gupta and H. C. Wu** (1995). Modification of bacterial lipoproteins. *Methods Enzymol.* **250**: 683-97.
- Santos, Y., P. G. Huntly, A. Turnbull and T. S. Hastings** (1992). Isolation of *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*) in association with rainbow trout mortality in the United Kingdom. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **12**: 209-210.
- Saul, F. A., J. P. Arie, B. Vulliez-le Normand, R. Kahn, J. M. Betton and G. A. Bentley** (2004). Structural and functional studies of FkpA from *Escherichia coli*, a cis/trans peptidyl-prolyl isomerase with chaperone activity. *J. Mol. Biol.* **335**(2): 595-608.
- Scapigliati, G., N. Romano and L. Abelli** (1999). Monoclonal antibodies in fish immunology : identification, ontogeny and activity of T- and B-lymphocytes. *Aquaculture* **172**: 3-28.
- Schuijffel, D. F., P. C. van Empel, A. M. Pennings, J. P. van Putten and P. J. Nijtjen** (2005). Successful selection of cross-protective vaccine candidates for *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. *Infect. Immun.* **73**(10): 6812-21.
- Secades, P., B. Alvarez and J. A. Guijarro** (2001). Purification and characterization of a psychrophilic, calcium-induced, growth-phase-dependent metalloprotease from the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(6): 2436-44.

- Secades, P., B. Alvarez and J. A. Guijarro** (2003). Purification and properties of a new psychrophilic metalloprotease (Fpp2) in the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **226**(2): 273-9.
- Secombe, C. J., T. Wang, S. Hong, S. Peddie, M. Crampe, K. J. Laing, C. Cunningham and J. Zou** (2001). Cytokines and innate immunity of fish. *Dev. Comp. Immunol.* **25**(8-9): 713-23.
- Segers, P., P. Vandamme, P. L. Steyn, W. Mannheim, H. Willekens, M. Bauwens, J. De Ley and K. Kerster** (1993). Phylogenetic studies of *Flavobacterium* and related organisms by DNA-rRNA hybridizations. In Advances in the Taxonomy and Significance of *Flavobacterium*, *Cytophaga* and Related Bacteria. Edited by P. J. Jooste. Bloemfontein, South Africa: University of the Orange Free State Press: 129-136.
- Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice and E. L. Schneider** (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175**(1): 184-91.
- Smith, S. G., V. Mahon, M. A. Lambert and R. P. Fagan** (2007). A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiol. Lett.* **273**(1): 1-11.
- Speit, G., C. Dennog, P. Radermacher and A. Rothfuss** (2002). Genotoxicity of hyperbaric oxygen. *Mutat. Res.* **512**(2-3): 111-9.
- Sutcliffe, I. C. and D. J. Harrington** (2004). Putative lipoproteins of *Streptococcus agalactiae* identified by bioinformatic genome analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek* **85**(4): 305-15.
- Suzuki, K., H. Arai, T. Kuge, T. Katagiri and S. Izumi** (2008). Reliability of PCR Methods for the detection of *Flavobacterium psychrophilum*. *Fish. Pathol.* **43**: 124-127.
- Tanguy, H.** (2008). Rapport final de la mission sur le développement de l'aquaculture. Ministère de l'agriculture et de la pêche.
- Thuvander, A.** (1989). Cadmium exposure of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Richardson: effects of immune functions. *J. Fish. Biol.* **35**(4): 521-529.
- Tjalsma, H., V. P. Kontinen, Z. Pragai, H. Wu, R. Meima, G. Venema, S. Bron, M. Sarvas and J. M. van Dijl** (1999). The role of lipoprotein processing by signal peptidase II in the Gram-positive eubacterium *bacillus subtilis*. Signal peptidase II is required for the efficient secretion of alpha-amylase, a non-lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **274**(3): 1698-707.
- Tobio, M., R. Gref, A. Sanchez, R. Langer and M. J. Alonso** (1998). Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration. *Pharm. Res.* **15**(2): 270-5.
- Toyama, T., K. KitaTsukamoto and H. Wakabayashi** (1996). Identification of *Flexibacter maritimus*, *Flavobacterium branchiophilum* and *Cytophaga columnaris* by PCR targeted 16S ribosomal DNA. . *Fish. Pathol.* **31**: 25-31.
- Urdaci, M. C., C. Chakroun, D. Faure and J. F. Bernardet** (1998). Development of a polymerase chain reaction assay for identification and detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Res. Microbiol.* **149**(7): 519-30.
- Vatsos, I. N., K. D. Thompson and A. Adams** (2006). Colonization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), eggs by *Flavobacterium psychrophilum*, the causative agent of rainbow trout fry syndrome. *J. Fish. Dis.* **29**(7): 441-4.
- Wang, Y., J. Fang, S. S. Leonard and K. M. Rao** (2004). Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* **36**(11): 1434-43.

## 7. Bibliographie

- Westerfield, M.** (2007). In: The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) 4th ed. *University of Oregon Press, Eugene.*
- Wiklund, T., L. Madsen, M. S. Bruun and I. Dalsgaard** (2000). Detection of *Flavobacterium psychrophilum* from fish tissue and water samples by PCR amplification. *J. Appl. Microbiol.* **88**(2): 299-307.
- Woese, C. R., L. Mandelco, D. Yang, R. Gherna and M. T. Madigan** (1990). The case for relationship of the *flavobacteria* and their relatives to the green sulfur bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **13**: 258-262.
- Woese, C. R., E. Stackebrandt, T. J. Macke and G. E. Fox** (1985). A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**: 143-51.
- Wood, C. and R. Munger** (1994). Carbonic anhydrase injection provides evidence for the role of blood acid-base status in stimulating ventilation after exhaustive exercise in rainbow trout. *J. Exp. Biol.* **194**(1): 225-53.
- Wood, E. M. and W. T. Yasutake** (1956). Histopathology of kidney disease in fish. *Am. J. Pathol.* **32**(4): 845-57.
- Wood, J. W.** (1974). t. p. a. t. Disease of pacific salmon, 2<sup>nd</sup> ed. Washington Department of Fisheries, Olympia.
- Yang, Y., J. J. Merriam, J. P. Mueller and R. R. Isberg** (1996). The psa locus is responsible for thermoinducible binding of *Yersinia pseudotuberculosis* to cultured cells. *Infect. Immun.* **64**(7): 2483-9.
- Yoshikawa, T., N. Okada, A. Oda, K. Matsuo, H. Kayamuro, Y. Ishii, T. Yoshinaga, T. Akagi, M. Akashi and S. Nakagawa** (2008). Nanoparticles built by self-assembly of amphiphilic gamma-PGA can deliver antigens to antigen-presenting cells with high efficiency: a new tumor-vaccine carrier for eliciting effector T cells. *Vaccine* **26**(10): 1303-13.
- Zelikoff, J. T.** (1998). Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals? *Toxicology* **129**(1): 63-71.
- Zhiyi, R. and Y. Haowen** (2004). A method for genotoxicity detection using random amplified polymorphism DNA with *Danio rerio*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **58**: 96-103.

## Résumé

### **Quantification et prévalence de *Flavobacterium psychrophilum* chez les truites arc-en-ciel d'aquaculture ; relation hôte-pathogène et réponse immunitaire.**

*Flavobacterium psychrophilum* est l'agent pathogène des flavobactérioses d'eau froide touchant essentiellement les salmonidés dont la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* d'élevage. Cette bactérie Gram négative a un très fort impact économique en aquaculture car elle peut causer jusqu'à 70 % de mortalité dans les bassins d'élevage. La flavobactérose se décline sous deux formes pathologiques : la maladie de l'eau froide touchant les poissons adultes et le syndrome de l'alevin de truite arc-en-ciel touchant les juvéniles.

Au cours de ce travail, une méthode de PCR quantitative a été proposée. Elle permet en moins de trois heures de détecter et de quantifier un nombre de copies du gène codant l'ARNr 16S de la bactérie dans les tissus du poisson. Cette méthode a été testée sur différentes suspensions bactériennes (*F. psychrophilum*, autres flavobactéries, autres pathogènes) afin d'en valider la spécificité. La sensibilité de la méthode de détection a été évaluée à 1 et 2 bactéries par PCR en fonction de la matrice biologique utilisée.

Une étude écotoxicologique a été menée et montre d'une part que *F. psychrophilum* est une bactérie hyper-sensible au cadmium comparée aux autres bactéries Gram négatives. Sa croissance est diminuée d'un facteur 2 en présence d'une contamination au Cd à 0,4 µM. D'autre part, nous avons constaté qu'une contamination de truites juvéniles par 1 µg CdCl<sub>2</sub>/L (2 mois) et une injection de  $5 \times 10^7$  flavobactéries par individu (1 mois) ne provoque aucune mortalité. L'expression génique mesurée sur ses poissons démontre que le cadmium peut avoir des effets contradictoires sur le système immunitaire du poisson, pouvant soit exacerber ou diminuer la réponse immunitaire selon l'organe considéré.

Un travail comparatif de la prévalence de la flavobactérie dans 7 sites aquacoles d'Aquitaine a démontré que la flavobactérie est omniprésente et que sa pathogénicité est contrôlée par le système immunitaire des poissons en bonne santé apparente. L'expression génique mesurée sur les poissons malades et apparemment sains nous apporte deux informations importantes : 1/ les gènes codant pour la métallothioneine A et l'interleukine 1-β sont de bons bio-marqueurs de la maladie et 2/ la répression des gènes codant pour le complexe majeur d'histocompatibilité 2-β, le facteur de croissance transformant β, le cluster de différenciation 8-α et l'immunoglobuline T dans la rate des poissons malades montre un effondrement du système immunitaire acquis nous permettant d'émettre l'hypothèse que ce phénomène déclenche l'apparition de la maladie. Ainsi, *F. psychrophilum* aurait un comportement de pathogène à virulence latente.

Afin d'imaginer de nouvelles mesures prophylactiques et pour mieux comprendre la pathogénicité de la bactérie, une analyse du protéome de la membrane externe couplée à l'annotation du génome séquencé a été effectuée. Il a été identifié entre autres 1/ des protéines d'adhésion et d'invasion des tissus et 2/ des protéines d'acquisition de métabolites de l'hôte. De plus, un nombre important de protéines immunogènes chez la truite potentiellement utilisable dans un cocktail vaccinant a été détecté. Afin de chercher un vecteur pour ce cocktail, des nanoparticules d'acide γ-glutamique et phénylalanine d'environ 100 à 200 nm de diamètre ont été synthétisées. Ces dernières constituent une approche séduisante pour vacciner les poissons avec des antigènes de *F. psychrophilum* encapsulés puis incorporés dans la nourriture.

Mots clefs : *Flavobacterium psychrophilum*, *Oncorhynchus mykiss*, relation hôte-pathogène, système immunitaire, détection, immunoprotection, cadmium, aquaculture.

## Abstract

### **Quantification and prevalence of *Flavobacterium psychrophilum* in farmed rainbow trout; host-pathogen relationship and immune response.**

*Flavobacterium psychrophilum* is the causative agent of cold water flavobacteriosis, a condition affecting mostly salmonid fish, including the farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. This Gram negative bacterium can cause up to 70% mortality in breeding tanks and has a very strong economic impact on the fish farming industry. Flavobacteriosis can take two pathological forms: the cold water disease affecting adult fish and the rainbow trout fry syndrome affecting juveniles.

In the present study, a method of quantitative PCR was devised that allowed for the detection and the quantification, within three hours, of the 16S rRNA copy number in fish tissues. This method's specificity was confirmed through the use of various bacterial suspensions (*F.psychrophilum*, others flavobacteria and others pathogens) and its detection limit was estimated to be 1 and 2 bacteria in broth and in biological matrices, respectively.

An ecotoxicological study was then performed that showed that, on the one hand, *F. psychrophilum* is cadmium hypersensitive compared to others Gram negative bacteria because its growth rate, compared to a control, is decreased by a factor 2 at a cadmium concentration of 0,4 µM. On the other hand, we observed that subjecting rainbow trout juveniles to a concentration of 1 µg CdCl<sub>2</sub>/L for 2 months prior to an injection of  $5 \times 10^7$  *F. psychrophilum* by fish didn't lead to any mortality. The gene expression which was measured on these fish demonstrated that cadmium can have contradictory effects on the immune system of fish, which could enhance or decrease the immune response depending of the organ.

A comparative work of the prevalence of flavobacteria in 7 fish farms within the Aquitaine region (France) demonstrated that the bacterium was endemic and present in asymptomatic fish. Gene expression levels were measured on diseased and asymptomatic fish and demonstrated that the genes metallothionein A and interleukine 1-β were good biomarkers of the disease and that repression of the genes major histocompatibility complex 2-β, transforming growth factor -β, cluster of differentiation α and immunoglobulin T in the spleen of diseased fish was indicative of a collapse of the acquired immune system. We therefore hypothesized that this event marked the beginning of the disease and that *F. psychrophilum* is mostly an opportunistic pathogen.

To prepare the development of new prophylactic techniques and to understand better the bacterium pathogenicity, an analysis of the outer membrane proteome coupled with sequencing of the bacterial genome was also performed. Furthermore, a significant number of immunogenic proteins were identified as good candidates for the preparation of a vaccine. Finally, γ-glutamic acid and phenylalanine nanoparticles of about 100 - 200 nm in diameter were synthesized to serve as potential vector for this vaccine. These nanoparticles should be tested to administrate *F. psychrophilum* antigens to fish through the digestive route.

Key words : *Flavobacterium psychrophilum*, *Oncorhynchus mykiss*, host-pathogen relationship, immune system, bacterial detection, immunoprotection, cadmium, aquaculture.