

EPIDEMIOLOGIE DE LA FURONCULOSE DES SALMONIDES

III. ECOLOGIE DE *AEROMONAS SALMONICIDA* PROPOSITION D'UN MODELE EPIDEMIOLOGIQUE*

Annie DUBOIS-DARNAUDPEYS

LABORATOIRE CENTRAL DE RECHERCHES VETERINAIRES

22, rue Pierre-Curie

94700 MAISONS-ALFORT

Ministère de l'Agriculture - Direction de la Qualité - Services Vétérinaires
avec la collaboration technique de

Marie-Hélène ARGENCE, Monique CAPARROS et de Geneviève DEHAND

RESUME :

Aeromonas salmonicida véhiculé par l'eau est collecté par la végétation et les sédiments. Ses supports permettent sa multiplication. En hiver, lorsque l'antagonisme bactérien est inactif au sein de ceux-ci, la bactérie peut être remise en

* Ces travaux ont été présentés dans le cadre d'une thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris (1976).

circulation et entrer en contact avec le poisson. Si l'animal est réceptif, la maladie s'extériorisera. Mais cela se produit principalement lors du réchauffement des eaux. A ce moment, les facteurs limitants dus à la flore bactérienne des sédiments élimineront presque totalement *A. salmonicida*. Le schéma épidémiologique proposé visualise le devenir possible de la bactérie.

I. - INTRODUCTION

Des études expérimentales ont montré d'une part que *Aeromonas salmonicida* survit dans l'eau en fonction de la minéralisation, du pH et de la température et, d'autre part, qu'il se multiplie dans les sédiments et la végétation (DUBOIS-DARNAUDPEYS, 1977).

Ensuite, la bactérie confrontée à des facteurs microbiotiques limitants tels, l'antagonisme bactérien, l'action bactériophagique, l'action bactériolytique due au *Bdellovibrio bacteriovorus* n'a vu sa dynamique de population affectée que par le premier de ces phénomènes (DUBOIS-DARNAUDPEYS, 1977).

Le présent travail aborde l'étude synthétique de l'expression de ces mécanismes au niveau d'une rivière à Salmonidés.

II. - MATERIEL ET TECHNIQUE

1. Secteur de rivière, prélèvements

Le choix d'une rivière à Salmonidés dominants s'est porté sur la « Juine » située dans le département de l'Essonne. Le tronçon étudié est localisé entre les sources et l'agglomération rurale de Méréville. Les rives sont bordées de cressonnères.

Deux salmonicultures sont implantées sur ce secteur. On délimite un secteur amont des piscicultures, un secteur aval immédiat et un secteur aval plus éloigné situé à 160 m de ce dernier. Au sein de chacun figurent les points de prélèvements, numérotés respectivement 1, 2 et 3.

De l'eau, de la végétation et des sédiments sont recueillis tous les quinze jours. L'eau est prélevée à environ 25 cm sous la surface, la flore est arrachée et les racines rincées dans l'eau de la rivière. La vase de surface est récoltée à l'aide d'une pelle spéciale. La flore bactérienne est également collectée sur tampon de gaze immergé dans l'eau (Anonyme).

2. Détection de la présence de *A. salmonicida*

Recherche indirecte :

A + 4°C, les bactériophages spécifiques de *A. salmonicida* peuvent se multiplier et ainsi témoigner de la présence de la bactérie puisqu'à cette température la croissance bactérienne n'est pas inhibée par l'effet antagoniste dû aux *Pseudomonas*.

A 100 g de sédiment ou d'herbe broyée sont additionnés 100 ml d'eau physiologique à 8‰ ainsi que 100 ml d'eau peptonée 2 fois concentrée.

Le tampon de gaze est exprimé dans l'eau physiologique puis additionné d'eau peptonée.

A. salmonicida (DUBOIS-DARNAUDPEYS, 1977) est introduit dans un échantillon témoin, de manière à s'assurer que les bactériophages présents sont susceptibles de se multiplier et d'être dépistés dans un laps de temps déterminé.

La présence ou l'absence de bactériophages est vérifiée au départ, après 4 jours, puis journallement. En cas de résultat négatif l'on contrôle pendant 11 jours. On s'assure d'un résultat positif par 2 contrôles successifs. Le prélèvement est chloroformé puis l'on dépose 3 fois 1 öse sur un tapis de la culture indicatrice (ADAMS, 1966).

Recherche des bactériophages :

Une recherche semi-quantitative est entreprise sur l'eau, la végétation, les sédiments. 24 fois 2 g d'échantillon conditionnés dans 24 tubes sont mis en contact avec 10 ml d'eau peptonée enrichie en bactérie détectrice. On incube 48 h à + 26° puis on chloroforme. L'on dépose, 2 fois 1 öse sur un tapis de culture indicatrice. A partir du nombre d'échantillons positifs, le pourcentage de positivité est calculé avec un coefficient de sécurité de 95 %.

III. - RESULTATS

1. Recherche indirecte de *A. salmonicida*

Les résultats portent sur la période allant d'avril à décembre 1974.

Les figures 1 et 2 mettent en évidence la présence ou l'absence de la bactérie aux 3 points et dans les 3 biotopes en fonction du temps (colonne de droite de chaque rectangle).

Le secteur amont est sensiblement plus riche en *A. salmonicida* que le secteur aval. On ne note pas de différence significative entre le secteur aval immédiat et aval éloigné. La bactérie est mise en évidence plus souvent pendant le deuxième semestre que pendant le premier.

2. Recherche des bactériophages

Les résultats portent sur 2 ans (tableaux n° 1 et 2).

En 1973, la végétation, bonne collectrice de bactéries, est plus riche en bactériophages au point 2 qu'aux points 1 et 3. Les piscicultures éliminent *A. salmonicida* qui est capté par la végétation du secteur immédiatement en aval.

En 1974, le pourcentage de bactériophages est plus faible que l'année précédente. Le secteur amont est négatif. La végétation du secteur aval est faiblement positive en janvier et en juillet-août. Au niveau des sédiments les bactériophages sont mis en évidence de janvier à mars. Au printemps au point 2 ils sont absents, peu nombreux au point 3. Puis de juillet à décembre ils sont présents aux points 2 et 3.

Tableau 1

	EAUX						VEGETATION						SEDIMENTS																										
	1		2.1		3.1		3.2		1		2.1		3.1		3.2		1		2.1		3.1		3.2																
% de positivité coefficient de sécurité de 95 % 1973																																							
Mars																	41-81	1-22	7-42		0-16	68-98	41-81	33-74	41-81	0-16	68-98	41-81	33-74	41-81	0-16	68-98	41-81	33-74	41-81				
Avril																	0-16	2-32	2-32		0-16	16-55	41-81	13-51	63-95	0-16	16-55	41-81	13-51	63-95	0-16	16-55	41-81	13-51	63-95				
Mai																	0-16	0-16	0-20		0-16	0-16	1-22	13-51	49-87	0-16	1-22	13-51	5-37	49-87	0-20	2-32	0-16	0-16	0-16				
Juin																	0-16	0-16	0-20		0-16	0-16	1-22	13-51	16-55	0-16	2-32	1-22	1-22	16-55	0-16	2-32	1-22	1-22	16-55				
Juillet																	1-22	0-16	5-37		0-16	7-42	5-37	7-42	0-20	0-16	7-42	0-16	7-42	0-20	0-16	7-42	0-16	7-42	0-20				
Août																	2-32	7-42	22-63		2-32	68-98	7-42	54-90	7-42	5-37	68-98	7-42	54-90	7-42	5-37	68-98	7-42	54-90	7-42				
Septembre																	78-99	268-98	84-100		80-100	84-100	84-100	84-100	84-100	80-100	84-100	84-100	84-100	84-100	80-100	84-100	84-100	84-100	84-100				
Octobre																	84-100	29-70	0-16		84-100	84-100	84-100	84-100	84-100	5-37	2-32	13-51	84-100	84-100	5-37	2-32	13-51	84-100	84-100				
Novembre																	6-47	6-47	1-34	18-63	59-96	13-53	4-41	82-100	59-96	59-96	13-53	4-41	82-100	59-96	59-96	13-53	4-41	82-100	59-96				
Décembre																	0-18	0-18	0-18	0-18	0-18	0-18	0-27	66-99	82-100	0-18	0-27	66-99	82-100	82-100	0-18	0-27	66-99	82-100	82-100				
																	0-18	0-18	0-18	0-18	0-18	0-18	0-18	22-68	82-100	0-18	22-68	4-41	82-100	82-100	0-18	22-68	4-41	82-100	82-100				
																	0-18	0-18	0-18	0-18	0-18	0-18	0-18	53-94	0-18	0-18	53-94	0-18	0-18	27-72	0-18	53-94	0-18	0-18	27-72				
																	0-27	0-18	10-53	0-18	53-94	82-100	0-27	0-18	4-41	53-94	82-100	0-27	0-18	4-41	53-94	82-100	0-27	0-18	4-41				

Tableau 2

% de positivité coefficient de sécurité de 95 % 1974	EAUX					VEGETATION					SEDIMENTS				
	1	2.1	2.2	3.1	3.2	1	2.1	2.2	3.1	3.2	1	2.1	2.2	3.1	3.2
	Janvier	0-16 0-20			0-16 0-16	0-16 0-16	0-16 5-37			0-16 5-37	0-20 5-37	0-16 0-16			2-32 37-78
Février	0-16 0-16			0-16 0-16	0-16 1-22	0-16 0-16			5-37 0-16	0-16 0-16	0-16 0-16			5-37 18-55	54-90 80-100
Mars	0-16 0-16			0-16 0-16	0-16 0-16	0-16 0-16			0,20 0,20	0-16 0-20	0-16 0-20			5-37 61-81	63-95 33-74
Avril	0-16 0-16			0-16 0-16	0-16 0-16	0-16 0-16			0-16 0-16	0-16 0-20	0-16 0-16			0-16 0-16	78-99 68-98
Mai	0-16 0-16			0-16 0-16	0-20 0-16	0-16 0-16			0-16 0-16	0-20 0-16	0-16 0-16			0-16 0-16	5-37 0-16
Juin	0-16 0-16			0-16 0-16	0-16 0-16	0-16 0-16			0-16 0-16	1-22 0-16	0-16 0-16			0-16 0-16	2-32 0-16
Juillet	0-16 0-16			0-16 0-20	0-16 1-22	0,20 0,20			0,20 22-63	0-20 7-42	0-20 0-16			0-16 2-32	0-20 29-70
Août	0-20 0-20			0-20 13-51	1-22 2-32	0-16 0-16			2-32 1-22	2-32 0-16	0-16 0-20			0-16 63-95	0-16 58-93
Septembre	0-16 0-16			0-16 0-16	0-16 0-16	0-16 0-16			0-16 0-16	0-16 0-16	0-16 0-16			13-51 0-16	19-59 0-16
Octobre	0-16 2-32			0-16 0-16	0-16 0-16	0-16 0,20			5-37 0-16	0-16 19-59	0-16 0-16			26-67 68-98	16-55 54-90
Novembre	10-46			54-90	80-100	0-16			0-16	0-16	0-16			1-22	0-16
Décembre											0-16			37-78	49-87

DISCUSSION

1. Justification des techniques et de leur spécificité

Il n'existe pas de milieu sélectif pour l'isolement de *A. salmonicida* donnant satisfaction (DUFF, 1940 ; O'LEARY, 1956). Après avoir essayé en vain la mise au point d'un tel milieu, nous avons envisagé la recherche indirecte de la bactérie par mise en évidence de la multiplication des bactériophages spécifiques dans certaines conditions thermiques.

Il est très difficile de déterminer avec précision la sensibilité de la méthode car trop de facteurs entrent en jeu, tels les effectifs de bactériophages, de *A. salmonicida*, de *Pseudomonas*. Nous avons vérifié qu'elle nous permet de déceler la présence de la bactérie avec beaucoup plus de fiabilité que la technique basée sur l'ensemencement classique de prises d'échantillons minimales. Elle ne demande aucun matériel spécifique tels que des anticorps, un sérum fluorescent... Sa spécificité est sûre car les bactériophages isolés ont toujours été actifs vis-à-vis de notre bactérie. La méthode est lente, elle demande de 6 à 11 jours et les résultats dépendent du pH qui doit être toujours maintenu entre 7,5 et 8.

Quant à la recherche semi-quantitative des bactériophages, la technique est des plus classiques (ADAMS, 1966). Le pourcentage de positivité des échantillons est encadré par son intervalle, calculé à partir des limites de confiance de la loi binomiale, avec un coefficient de sécurité de 95 %.

Les résultats obtenus lors de la recherche de *A. Salmonicida* et des bactériophages, ainsi que ceux ayant trait aux comportements de la bactérie vis-à-vis des facteurs abiotiques et microbiotiques de l'environnement, nous conduisent à proposer un modèle de la dynamique de la population du germe dans l'écosystème.

Cette étude porte sur la période allant du 22 avril au 9 décembre 1974.

Nous avons pu mettre en évidence les limites d'action de l'antagonisme bactérien au sein des sédiments.

L'activité antagoniste varie en fonction de la physicochimie de ces derniers (matières organiques issues des rejets provenant des piscicultures).

Au point amont, nous avons vérifié qu'au printemps l'antagonisme est efficient après une première élévation de température à + 17°C, tandis qu'en automne il cesse d'exercer ses effets entre + 13 et + 10°C et au-dessous.

A l'aval immédiat des piscicultures, l'antagonisme est actif à + 10,5°C en avril.

A l'aval plus éloigné, il est efficient à 14°C en mai. En automne, il devient inactif entre + 13 et + 10°C, cela comme au point amont, toutefois peut-être plus près de + 10°C.

Nous disons donc qu'au printemps, l'antagonisme devient fonctionnel à des températures d'autant plus élevées que la charge en matière organique est plus faible (Fig. 1 et 2).

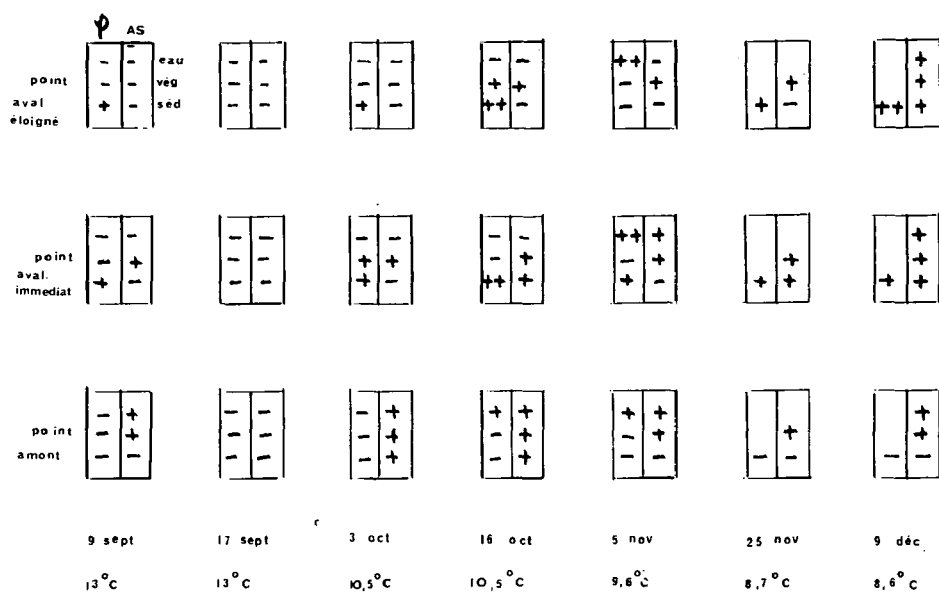


Fig. 1 : Recherche de *A. salmonicida* et des bactériophages pendant la période allant du 9 septembre au 9 décembre 1974.

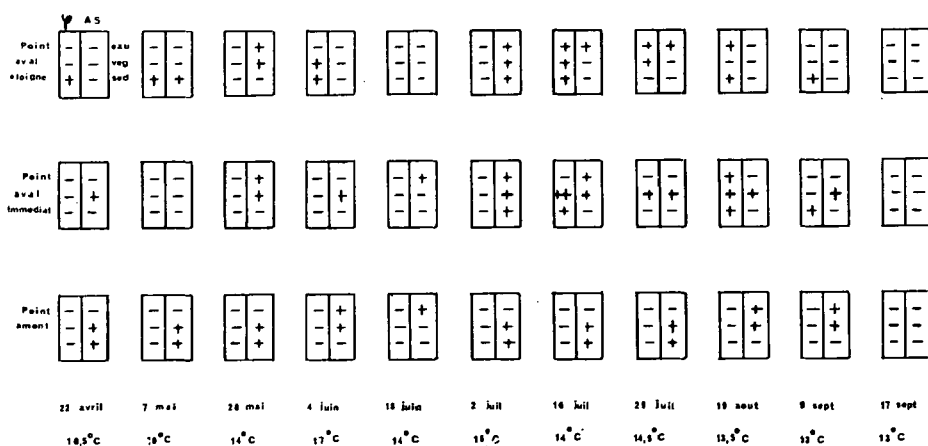


Fig. 2 : Recherche de *A. salmonicida* et des bactériophages pendant la période allant du 22 avril au 17 septembre 1974.

Nous avons vérifié qu'au printemps, il faut que les eaux atteignent + 14°C pour que les poissons de pisciculture excrètent *Aeromonas salmonicida*. Cette dissémination bactérienne n'est pas continue. La température peut s'élever sans pour autant favoriser la production de la bactérie.

Au cours de l'été, la température passe de 16°C au début juillet à + 13°C fin septembre. La disparition de la bactérie s'effectue progressivement.

Les germes circulants, libérés par les poissons en été, ont eu pour effet de contaminer les sédiments. Au sein de ceux-ci, l'antagonisme actif limite leur multiplication. Ils sont certes présents en faible quantité mais indétectables directement par notre méthode de recherche.

En automne, on observe une émission de *A. salmonicida* à partir des sédiments. Celle-ci cesse en novembre du fait de la baisse de la température des eaux. Mais cet apport de germe en octobre a eu probablement pour effet de permettre l'ensemencement des poissons. A ces températures, les truites ne présentent pas les symptômes de la furunculose, mais multiplient cependant les bactéries. Ceci est confirmé par la présence du germe en aval immédiat, d'abord sur la végétation (3 octobre), puis sur la végétation et le sédiment (16 octobre), et sur l'eau, la végétation et les sédiments en décembre.

La production bactérienne par les poissons ensemence à son tour l'ensemble de l'environnement.

A partir de ces données, nous allons essayer de suivre le cheminement possible du flux bactérien dans l'environnement et dans le poisson.

La figure 3 schématise toutes les possibilités de circulation du flux au sein de l'écosystème étudié.

La représentation choisie est celle d'un système à 6 compartiments, dont l'un est symboliquement ouvert (environnement), les cinq autres étant l'eau (E), la végétation (V), le sédiment (S), le poisson des eaux libres (P), le poisson de pisciculture (PP).

Nous retiendrons 38 relations possibles, entre les compartiments qui sont autant d'axes de circulation potentiels du flux de *Aeromonas salmonicida*.

L'essai de modélisation de la furunculose sous la forme d'un système à compartiment a été retenu, d'une part pour sa commodité de figuration et, d'autre part, compte tenu de son utilisation actuelle en épidémiologie pisciaire (TUFFERY, 1977).

Le schéma visualise les entrées générales du germe par l'eau (1) et les poissons porteurs (2, 13), les sorties du système par l'eau (37), les poissons qui dévalent (38), les poissons capturés à la pêche (10, 24, 35), les poissons de pisciculture (14) et le faucardage, support éventuel de la bactérie (9, 25, 36).

A cela s'ajoutent toutes les relations entre les compartiments situés dans trois sous-systèmes correspondant aux secteurs étudiés.

Le sous-système 1, figurant le point le plus en amont sur la rivière, peut héberger des poissons provenant de la zone des sources et dévalant jusqu'à lui et même au-delà par le biais de l'eau, il reçoit *A. salmonicida* du secteur amont libéré par les sédiments et par les animaux.

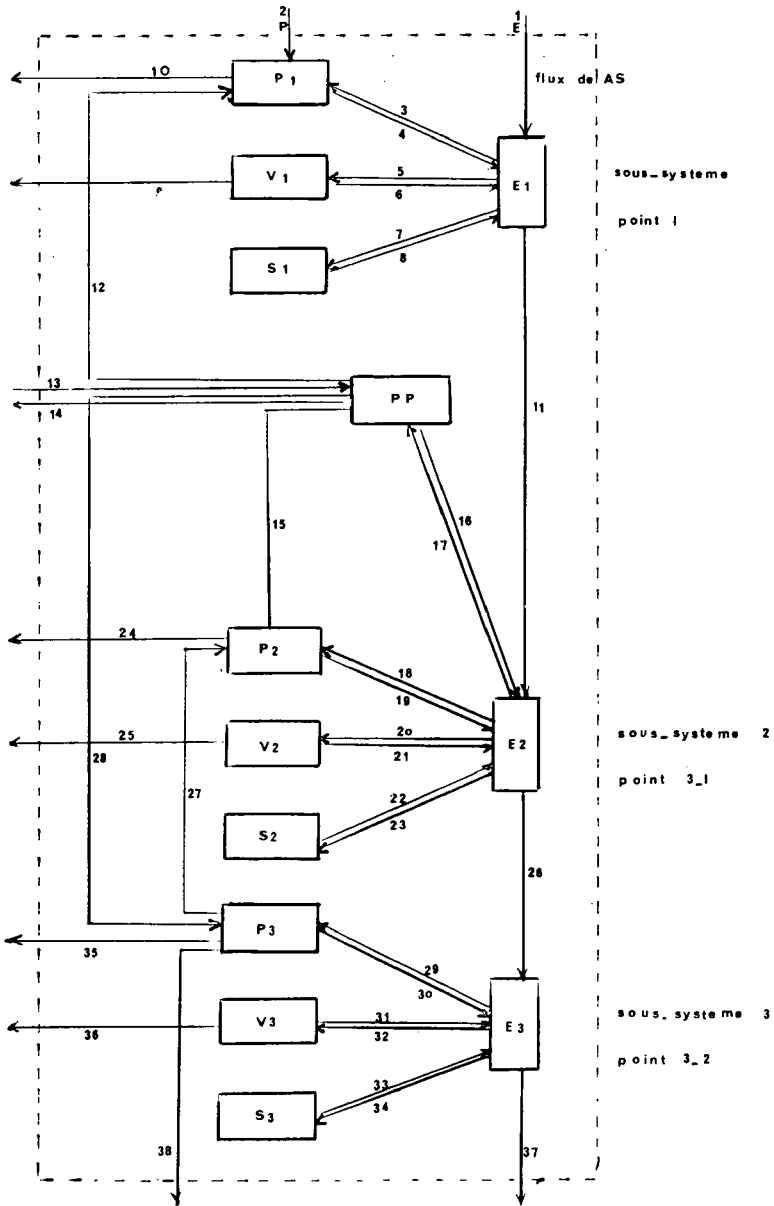


Fig. 3 : Devenir possible de *A. salmonicida* au sein du système
E eau, V végétation, S sédiment, P poisson, PP poisson
de repeuplement.

Les truites de la pisciculture sont utilisées pour les réempoissonnements des 3 sous-systèmes. Aux 3 points, les repeuplements (relations 12, 15, 28) sont de même importance et les pêcheurs aussi nombreux. Il faut signaler que la mise des poissons à la rivière a lieu le mardi ou le mercredi et qu'à la fin de la semaine suivante pratiquement tous les animaux ont été repris (relations 10, 24, 35).

Cette rivière est faiblement peuplée en dehors de la période de pêche. On peut observer en hiver quelques truites fario venant frayer aux points amont et aval immédiats.

Le sous-système 2 et, de façon moindre, le sous-système 3 reçoivent les eaux qui viennent de traverser la pisciculture. Ils sont donc beaucoup plus exposés à un flux de *A. salmonicida* que le sous-système 1 alimenté par les eaux des sources qui n'abritent què quelques poissons. Les flux bactériens 1 et 11 sont minimes, 26 est important et 37 est moindre.

De mai à septembre, la rivière est faucardée régulièrement, les *Aeromonas* épiphytes (relations 9, 25, 36) peuvent être éliminés. A ce moment, le flux 26 n'est pas épuré par la barrière végétale et ainsi le sous-système 3 est plus intensément exposé à la bactérie.

Nous avons essayé de schématiser les états et localisations possibles d'un flux bactérien dans un écosystème aquatique.

La figure 4 nous permettra de suivre le flux probable de *A. salmonicida* dans un écosystème aquatique selon différentes voies. L'eau n'est qu'un véhicule. Nous avons vu qu'elle ne permet pas la multiplication bactérienne et qu'elle n'est pas non plus le siège d'activités antagonistes (DUBOIS-DARNAUDPEYS, 1977).

Nous résumerons ainsi les différentes possibilités d'état de la bactérie :

- *Aeromonas* présent dans l'eau peut-il se fixer ?
- Le support permet-il sa survie ? (nous n'avons intégré que le poisson, les sédiments et la végétation)
- Le support permet-il sa multiplication ? (si cela est possible, il s'agit du poisson et du sédiment)
- Existe-t-il des facteurs limitant la multiplication ? (chez les poissons interviennent les facteurs neutralisants et dans les sédiments essentiellement l'antagonisme bactérien).
- Ces facteurs jouent-ils leur rôle ?

Ceux-ci ne sont pas totalement efficaces à un même moment puisque leur optimum d'activité n'est pas conditionné par les mêmes facteurs physico-chimiques. L'origine du germe variera mais on notera toujours la présence de la bactérie dans l'eau.

Au centre du schéma fonctionnel nous avons fait figurer le flux hydrique. L'eau assurera le contact entre la bactérie et les poissons, les sédiments et la végétation.

Au sein de ceux-ci apparaissent les différents facteurs stimulant ou limitant la croissance de la bactérie. Le bilan des opérations qui se réalisent dans chaque compartiment de l'environnement se traduira à chaque sortie par l'absence ou la présence de celle-ci. Dans ce dernier cas, remise en circulation, elle rejoindra le point de départ. Le cycle sera alors bouclé.

Ce schéma fonctionnel du devenir de *Aeromonas salmonicida* ne fait pas intervenir le temps. Son but est de faire apparaître les différents états possibles de la bactérie et sa localisation.

IV. - CONCLUSIONS

Nous avons observé, sur un tronçon de la rivière la Juine, qu'il s'établit un véritable cycle de transfert de *Aeromonas salmonicida* entre les poissons et les sédiments. Au niveau des poissons ceci est démontré indirectement.

Il est donc impossible de ne pas introduire l'environnement dans l'explication de l'épidémiologie de la maladie.

Nous avons étudié les relations existantes entre les bactéries et l'environnement, notamment les valeurs des variables qui font que le germe est capable d'atteindre des effectifs tels qu'il pourrait exprimer son pouvoir pathogène sous la forme d'une maladie, remplaçant ainsi la bactériose dans son contexte écologique.

REMERCIEMENTS

Je remercie Monsieur G. TUFFERY et Mademoiselle A.M. BAUDOY du Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires d'Alfort pour leurs suggestions et critiques dans la réalisation de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS M.H., 1966. Bactériophages. Interscience Publishers, Inc., second edition.
- DUBOIS-DARNAUDPEYS Annie, 1977. Epidémiologie de la furunculose des Salmonidés.
- I. Etude expérimentale des conditions de survie et de multiplication de *Aeromonas salmonicida* dans un environnement abiotique, Bull. Fr. Pisc. 264, 121-127.
 - II. Etude expérimentale de divers facteurs microbiotiques de l'environnement, Bull. Fr. Pisc. 265, 128-133.
- DUFF D.C.B., Mc ARTHUR M.J., THOMPSON H.G., 1940. Observation on the viability of *Bacterium salmonicida*, J. Fish. Res. Bd. Can. 5 (1).
- O'LEARY W., PAMOS C., HELZ E., 1956. Studies on the nutrition of *Bacterium salmonicida*, J. Bacteriol., 72, 673-676.
- TUFFERY G., 1977. Recherches sur la Bucéphalose à *Bucephalus polymorphus* Baer 1827. Introduction à l'écologie des systèmes piscicoles, Thèse de 3^e cycle, Université Pierre et Marie Curie, Paris. 1977.
- ANONYME : Standard methods for the examination of water and wastewater, 13th Edition 1971.