

Rapport technique projet AX3 : dossier N°310310158

Recherche du pathogène responsable de la PKD dans le secteur de l'Ariège et analyse des facteurs physiologiques et environnementaux associés

Mots-clés : *santé de la faune piscicole, interactions poisson-pathogène, stress environnementaux, qualité de l'eau, Proliferative Kidney Disease, truite fario Salmo trutta*

Lisa Jacquin, Géraldine Loot laboratoire EDB, Université Toulouse 3 Paul Sabatier et & Simon Blanchet, laboratoire SETE CNRS Moulis lisa.jacquin@univ-tlse3.fr

Version corrigée



Collaborateurs: Eloïse Duval doctorante SETE/EDB, Laurine Gouthier M2 EDB, Erwan Quéméré INRAE Rennes, Jessica Côte postdoctorante, Charlotte Veyssière IE EDB, Laurent Garmendia & Allan Yotte, fédération de pêche de l'Ariège, Armand Lautraite vétérinaire, Séverine Jean, Annie Perrault Laboratoire Ecolab/LEFE, et Sophia Hansson LEFE/ENSAT, Johanna Bricout EDB/LEFE pour l'étude pilote sur les contaminants, Margaux Saüt et Jean-Pierre Rebillard de l'Agence de l'Eau.

Opération réalisée avec le concours de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne et l'Université Paul Sabatier

Prestations pour l'Agence de l'Eau Adour-Garonne: terrain et prélèvement de truites en Ariège en 2018 (en partenariat avec la Fédération de pêche de l'Ariège), mise au point et analyses de marqueurs physiologiques et d'une méthode de détection non létale d'ADN du pathogène PKD dans l'urine de poisson, analyse de facteurs environnementaux et individuels associés à la présence du pathogène. Le travail financé par l'Agence de l'Eau Adour-Garonne et l'Université Paul Sabatier a ensuite servi de base à un projet à plus large échelle financé par l'OFB (co-PIs : N Poulet, S Blanchet, G Loot). Un projet ANR récemment acquis permettra de poursuivre ce travail sur les 4 prochaines années, en partenariat avec la Région Occitanie.

Le financement de l'Agence de l'Eau AX3 a permis :

- ⇒ Le financement des missions de terrain 2018
- ⇒ Le soutien humain pour le terrain et les analyses en laboratoire (Charlotte Veyssière, Laurine Gouthier)
- ⇒ Le financement de frais de matériel et d'analyses

RESUME

Au cours de ces dernières décennies, l'augmentation des maladies émergentes dans le monde a eu d'importantes répercussions sur la santé humaine et animale. L'émergence de maladies infectieuses est déterminée par de nombreux facteurs, mais les **interactions entre l'environnement, l'hôte et les pathogènes** sont encore mal comprises. *Tetracapsuloides bryosalmonae* est un myxozoaire responsable de la maladie rénale proliférative (Proliférative Kidney Disease ou PKD) qui peut dans certains cas causer d'importantes mortalités de salmonidés en France depuis quelques années, avec des conséquences socio-économiques importantes, mais dont les dynamiques épidémiques sont encore mal comprises. Ce pathogène émergent fait l'objet d'un suivi depuis 2016 en Ariège dans le cadre des volets précédents du projet (projets AX1 et AX2). Les objectifs de ce projet AX3 étaient de poursuivre ce travail en mettant au point une méthode de détection non létale d'ADN du pathogène émergent *Tetracapsuloides bryosalmonae* dans l'urine de truite fario *Salmo trutta* et en explorant les effets de quelques facteurs environnementaux et individuels pouvant influencer les interactions truite-pathogène.

1. Premièrement, ce travail a permis la mise au point d'une **technique non invasive de détection** de l'ADN du pathogène dans l'urine des truites, effectuée par la doctorante Eloïse Duval encadrée par S Blanchet, G Loot et E Quéméré. Les résultats du projet AX3 valident cette technique non létale, qui permet de détecter efficacement la présence du pathogène dans l'urine sans euthanasier les poissons, et dans une moindre mesure la charge parasitaire, mais donne des informations différentes de l'ADN détecté dans le rein par observation visuelle. Cette étude valide donc l'usage de l'ADN urinaire (appelée ADN_u) comme méthode non invasive de mesure de prévalence parasitaire chez les truites, qui sera appliquée à plus large échelle dans la thèse d'Eloïse Duval et les projets suivants (projets OFB et ANR).

2. Deuxièmement, une étude pilote a été conduite sur les corrélations entre infection à la PKD chez la truite et plusieurs **facteurs environnementaux** (notamment eutrophisation) et **individuels** (caractéristiques génétiques) à partir des données de 2016 à 2019 dans le cadre du stage de M2 de Laurine Gouthier. Les résultats préliminaires montrent que la température et l'**eutrophisation** sont associés à une plus forte prévalence du pathogène tandis que la diversité génétique des truites n'avait pas d'effet clair. Les mécanismes sous-jacents expliquant ces effets seront explorés de manière plus détaillée dans la thèse d'Eloïse Duval et le projet OFB à plus large échelle.

3. Troisièmement, ce rapport présente des résultats préliminaires sur les effets des **contaminants métalliques** dans le cadre d'un projet pilote (ADI UFT, stage de Johanna Bricout). Les résultats préliminaires montrent des niveaux hétérogènes mais relativement peu élevés de contamination métallique dans les sédiments des sites étudiés, mais pas d'effets négatifs sur la prévalence ni sur les biomarqueurs de santé des truites. L'étude future financée par l'ANR et la Région Occitanie permettra d'étendre cette étude à un gradient plus large de contamination et de stress environnementaux, afin de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent l'émergence de la PKD en milieu naturel en prenant en compte à la fois les conditions environnementales et les caractéristiques de l'hôte dans les mêmes populations.

CONTEXTE ET OBJECTIFS

Au cours de ces dernières décennies, l'augmentation des **maladies émergentes** dans le monde a eu d'importantes répercussions sur la santé humaine et animale (Kahn 2017). L'émergence ou la réémergence de maladies infectieuses est déterminée par de nombreux facteurs (Altizer et al. 2013; Okamura et al. 2011), mais les **interactions entre l'hôte, les pathogènes et l'environnement** sont encore mal comprises, en particulier dans les populations sauvages (Fig 1).

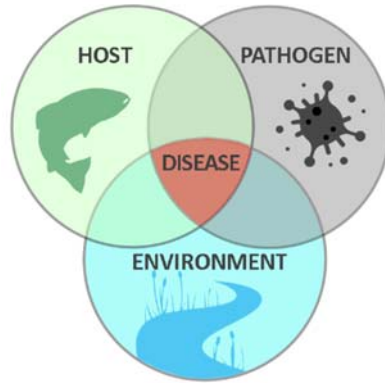
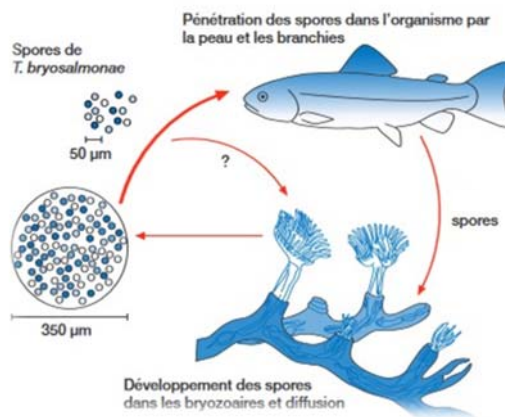


Fig 1 : Tryade épidémique montrant les effets conjoints des caractéristiques de l'hôte, du pathogène et de l'environnement sur l'occurrence de maladies dans la faune sauvage.

Les objectifs de ce projet AX3 étaient de mettre au point une **méthode de détection non létale** d'ADN du pathogène émergent *Tetracapsuloides bryosalmonae* dans l'urine de truite fario *Salmo trutta*, et de mieux comprendre les facteurs environnementaux et individuels influençant les interactions entre truite-pathogènes. Ce pathogène émergent myxozoaire responsable de la maladie rénale proliférative (Proliferative Kidney Disease ou PKD) fait l'objet d'un suivi depuis 2016 en Ariège (Lautraite 2017). Il infecte des bryozoaires (hôte final), qui relâchent des spores infectant ensuite des salmonidés (hôte intermédiaire) (Dash et Vasemägi 2014) (Fig 2). La PKD peut causer d'importantes mortalités de salmonidés (20 à 100% de taux de mortalité selon les populations touchées) avec des conséquences socio-économiques importantes en France et en Europe (Sterud et al. 2007). Cependant, les **facteurs environnementaux et individuels** associés à cette maladie émergente sont encore mal compris (Okamura et al. 2011), ce qui entrave notre capacité à limiter les effets de ce pathogène sur la faune piscicole.



(Reproduction : S.F.S. Nadler).

Figure 2 : Représentation du cycle de vie du pathogène *Tetracapsuloides bryosalmonae*

Lors des phases précédentes du projet (AX1 et AX2), un ensemble de **biomarqueurs** ont été mis au point en collaboration avec la Fédération de pêche de l'Ariège (Laurent Garmendia, Alla Yotte) et le vétérinaire Armand Lautraite, afin de suivre l'état de santé des truites (Garmendia 2017a, 2017b; Jacquin et al. 2017, 2018; Lautraite 2017). Ces travaux collaboratifs ont permis de détecter la présence du pathogène dans plusieurs zones et des effets potentiels sur la dynamique des populations, sur la santé des poissons, notamment au stade juvénile (Garmendia 2017a; Jacquin et al. 2017; Lautraite 2017). Ces travaux ont également soulevé plusieurs questions quant aux facteurs de **stress environnementaux** qui pourraient favoriser la présence du pathogène, notamment la qualité de l'eau.

Le premier objectif de ce projet AX3 était de (1) mettre au point une **méthode non invasive** de détection du pathogène dans l'urine des poissons afin de mettre en place un suivi à plus large échelle géographique sans euthanasier les poissons, grâce aux travaux Eloïse Duval, doctorante (co-encadrée par Géraldine Loot, Simon Blanchet, Erwan Quéméré, projet cofinancé par l'OFB). Le deuxième objectif était (2) d'étendre les populations prélevées grâce à cette nouvelle méthode, et de tester les corrélations entre **facteurs environnementaux** (notamment eutrophisation), **caractéristiques génétique** des truites et prévalence du pathogène (stage de M2 de Laurine Gouthier, qui sera étendu par la thèse d'E Duval) (Fig 3). Enfin, une étude pilote a été démarrée pour explorer les liens avec la **contamination métallique** du milieu (étude pilote, stage de Johanna Bricout, collaboration avec Sophia Hansson).

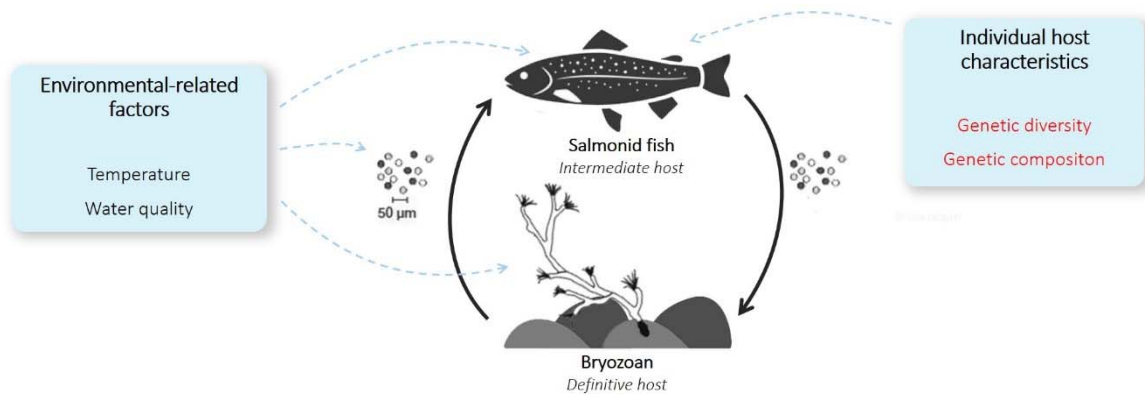


Fig 3. effets potentiels des facteurs environnementaux (gauche) et individuel (droite) sur le cycle du pathogène *Tetracapsuloides bryosalmonae*

MATERIEL ET METHODES

Système d'étude

La truite fario (*Salmo trutta*) est un salmonidé natif d'Europe introduit dans plusieurs continents. Dans les dernières décades un nombre croissant de populations de truite est touché par la maladie émergente de la Proliférative Kidney disease (PKD) (ou Maladie Rénale Proliférative MPR) causée par l'endoparasite myxozoaire *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Dash et Vasemägi 2014; Hedrick, MacConnell, et de Kinkelin 1993; Sterud et al. 2007). Ce parasite exploite les salmonidés comme hôte intermédiaire et un bryozoaire d'eau douce comme hôte final (Hartikainen et Okamura 2015; Sudhagar, Kumar, et El-Matbouli 2020). Quand les conditions environnementales deviennent favorables (celles-ci sont encore mal connues), les spores du pathogène sont relargués par les bryozoaires dans l'eau et infectent de façon aléatoire les poissons. Les spores pénètrent dans les branchies et la peau, entrent dans la circulation sanguine et colonisent les reins, organe cible principal du pathogène, dans lequel il prolifère avant d'être excrété dans l'urine puis dans l'eau (Okamura et al. 2011). Les poissons infectés souffrent alors d'une prolifération cellulaire très importante dans leurs reins, causant une hyperplasie rénale et des reins gonflés caractéristiques, une réponse immunitaire inflammatoire typique (Clifton-Hadley, Bucke, et Richards 1987; Hedrick, MacConnell, et de Kinkelin 1993; Okamura et al. 2011). De plus, le rein étant le principal organe d'hématopoïèse (production d'erythrocytes *i.e.* globules rouges et de lymphocytes globules blancs), la PKD résulte souvent en une immunodépression et surtout une anémie sévère pouvant causer la mort du poisson par hémocrite (proportion de globules rouges) du sang trop basse (Bettge et al. 2009; Clifton-Hadley, Richards, et Bucke 1987), altérant le transport d'oxygène et résultant en une mortalité très élevée (20% à 100% selon les conditions environnementales) (Hedrick, MacConnell, et de Kinkelin 1993; Sterud et al. 2007). Ce pathogène est donc probablement une force de sélection importante dans les populations sauvages. Il peut être responsable d'un déclin des populations de truites localement a été documentée dans certaines zones par certaines FDAAPPMA (Garmendia 2017a). En 2016, le pathogène a été identifié pour la première fois en Ariège par le vétérinaire A Lautraite en collaboration avec L Garmendia de la fédération de pêche d'Ariège et un suivi de certaines populations a été entamé ainsi qu'un suivi thermique (Garmendia 2017a, 2017b; Jacquin et al. 2017, 2018; Lautraite 2017). Le présent rapport concerne une étude centrée sur certains facteurs environnementaux (notamment eutrophisation et contaminants métalliques) et individuels (génétiques) associés à la prévalence du pathogène.

Zone d'étude et données environnementales

En 2018 (septembre/octobre), 17 sites ont été échantillonnés à une échelle locale afin de procéder à des analyses physiologiques et de mettre au point la méthode de détection du pathogène dans les urines, grâce au soutien logistique de la Fédération de pêche de l'Ariège que nous remercions. En 2019, 50 sites supplémentaires ont été échantillonnés à une échelle régionale plus large dans le cadre de la thèse d'Eloïse Duval et du projet PKD OFB pour les analyses environnementales. Entre 6 et 25

Code	Site	Rivière	Distance à la rivière (m)	Altitude (m)	N	Prévalence (%)
------	------	---------	------------------------------	-----------------	---	-------------------

Sites échantillonnés en 2019 (financé par le projet PKD OFB, thèse d'Eloïse Duval)						
ADOAur	Aurensan	Adour	60	259	20	55
ALACas	Castéra-Lou	Alaric	21	279	20	90
ARABas	Bas des gorges	Arac	27	477	20	0
ARBBar	Barat	Arbas	3	390	20	5
ARBMan	Manne	Arbas	18	310	19	5
ARGFoi	Foix	Arget	20	383	20	0
ARGPon	Pont du couvent	Arget	13	467	20	0
ARIVar	Varilhes	Ariège	87	324	20	75
ARRGou	Gourgues	Arros	27	299	20	90
ARRMou	Moulédous	Arros	43	232	11	90
ARZDur	Durban	Arize	27	351	20	60
ARZPon	Pont Couvent	Arize	17	383	20	0
BAUSou	Soueich	Baup	9	440	20	100
BOUAuc	Aucazein	Bouigane	17	550	20	0
BOUSer	Sère-Rustaing	Boues	18	370	20	95
BRUCha	Château Usson	Bruyante	12	829	20	0
DOUPer	Pérelle	Doucrouyre	15	457	20	5
ECHJui	Juillan	Echez	7	340	20	100
GARFos	Fos	Garonne	51	544	20	15
GARore	Ore	Garonne	75	460	20	15
GARVil	Villeneuve	Garonne	105	385	20	25
GAVLau	Lau-Balagnas	Gave de Pau	47	421	20	0
GAVRie	Rieulhes	Gave de Pau	71	340	20	5
GERAsp	Aspet	Ger	16	449	19	0
GERPoi	Pointis-Inard	Ger	32	330	19	0
GERSou	Soueich	Ger	25	378	20	0
GRAMon	Montastruc	Grande Baise	17	325	20	80
GRSLas	Lassale	Gers	14	360	10	100
HERCam	Camont	Hers	57	345	15	80
JOBEnc	Encausse-les-Thermes	Job	17	370	20	95
JOBLab	La Bouche	Job	9	440	19	0
LEZArr	Arrouy	Lez	26	490	19	0
LEZAub	Aubert	Lez	32	417	20	0
NESane	Anères	Neste	69	469	20	0
NESArr	Arreau	Neste	34	730	20	0
NESSar	Sarrancolin	Neste	44	630	20	5
NISLom	Lombrès	Nistos	15	477	18	0
ONELuc	Luchon	One	21	621	20	0
ORIOrg	Orgeix	Oriège	21	829	20	0
OURSar	Sarp	Ourse	21	471	20	0
PIQCig	Cierp-Gaud	Pique	39	480	20	0
PIQCil	Cier de Luchon	Pique	29	589	20	0
PIQRav	Ravi	Lys	12	844	12	0
SALTau	Taurignan-Castet	Salat	50	360	8	25
SAVVil	Villeneuve-Lécussan	Save	10	464	19	100
SIOSta	St-Paulet	Sios	12	450	20	0
SIOTra	Tramezaignes	Sios	15	410	20	5
TORTuz	Tuzaguet	Torte	10	530	13	77
TOUFre	Freychinandel	Touyre	12	626	20	0
VICNia	Niaux	Vicdessos	32	541	20	0
Total	50				941	

Les paramètres physico-chimiques utilisés dans cette étude ont été extraits de la base de données de l'Agence de l'Eau SIEAG : la conductivité, le pH, la matière organique en suspension (SOM), les nitrates, les nitrites, les orthophosphates (PO₄), le phosphore, l'oxygène dissous (O₂d) et la température moyenne de l'eau. Ces facteurs physico-chimiques ont été sélectionnés en raison de leurs effets sur la physiologie des poissons (Côte et al. 2021), et relevés pour les mois de mai, juillet et septembre, de 2016 à 2019. En plus de ces paramètres, l'altitude et la distance à la source pour chaque site ont également été prises en compte car le gradient amont-aval peut avoir une forte

influence. Les valeurs d'altitude ont été récupérées via le site Géoportail et celles de distance à la source sur la base de données Réseau Hydrographique Théorique (RHT) (Pella et al. 2012), car les zones de basse altitude pourraient potentiellement être plus favorables au pathogène.

Les données températures avaient aussi été enregistrées par datalogger en 2019 (an In-Situ® Aqua TROLL 500 Multiparameter probe) par Eloïse Duval en complément des sondes de la Fédération de Pêche de l'Ariège dans le cadre de sa thèse entre juillet et septembre 2019, période critique pour le développement de la PKD (Clifton-Hadley, Richards, et Bucke 1986; Hedrick, MacConnell, et de Kinkelin 1993; Wahli et al. 2002). Basé sur des études précédentes (Rubin et al. 2019; Schmidt-Posthaus, Hirschi, et Schneider 2015) deux paramètres de température ont été calculés grâce à ces sondes la (i) température moyenne estivale (juillet-septembre), et le (ii) nombre de jours (%) avec une moyenne journalière $\geq 15^{\circ}\text{C}$ (nombres de jours $\geq 15^{\circ}\text{C}$ / nombres de jours enregistrés) (Garmendia 2017b). Ce seuil de 15°C est cependant est cependant remise en cause par des études récentes dans la zone d'étude (Garmendia 2017b). La cohérence entre les deux bases de données (Agence de l'eau et par datalogger) étant très bonne, **ce sont les données issues de la base de données Agence de l'Eau seront présentées dans ce rapport lorsqu'elles étaient disponibles** (sauf pour les jours $>15^{\circ}\text{C}$ obtenus par datalogger grâce au soutien de la Fédération de pêche de l'Ariège et à la these d'Eloïse Duval). En complément, la lithologie (composition du substrat: sédimentaire, magmatique ou métamorphique) a également été intégrée comme covariable (Carraro et al. 2017) à partir des données du Bureau de Recherches Géologiques et Minières (BRGM, <http://www.geocatalogue.fr/Detail.do?id=6388>) en utilisant le logiciel QGIS (QGIS Development Team 2008). Cependant, la lithologie n'avait pas d'effet dans les modèles et ne sera donc pas présenté dans ce rapport.

Toutes données sont issues de la base de données publique SIE Agence de l'Eau (sauf pour les jours $>15^{\circ}\text{C}$ obtenus par datalogger grâce au soutien de la Fédération de pêche de l'Ariège et à la these d'Eloïse Duval). Une analyse en composante principale ACP (*PCA* fonction R package *FactoMineR* v.2.3 and *factoextra* v.1.0.7 (Lê, Josse, et Husson 2008) a ensuite été utilisée pour prendre en compte les corrélations entre variables (Fig. 5 et Table 2) et extraire des axes environnementaux intégratifs. Les 3 premiers axes expliquaient 79% de la variance totale (40%, 25% and 14% respectivement). Trois axes se sont dégagés : un premier axe représentait un gradient d'eutrophisation avec des sites très eutrophisés correspondant à des niveaux élevés d'azote, de phosphore, de matière organique et de température et des taux d'oxygène bas. Un second axe représentait un gradient chimique (conductivité et pH) avec des niveaux élevés de conductivité et de pH. Enfin un troisième axe représentait un gradient de distance (distance à la source). Pour intégrer ces trois gradients physicochimiques dans les analyses statistiques, les coordonnées de chaque site sur ces axes ont été relevées et incluses dans tous les modèles (Table 3). Ces trois gradients

environnementaux ont donc été intégrés comme covariables dans tous les modèles statistiques finaux, afin de tester leurs effets sur les interactions poissons-pathogène.

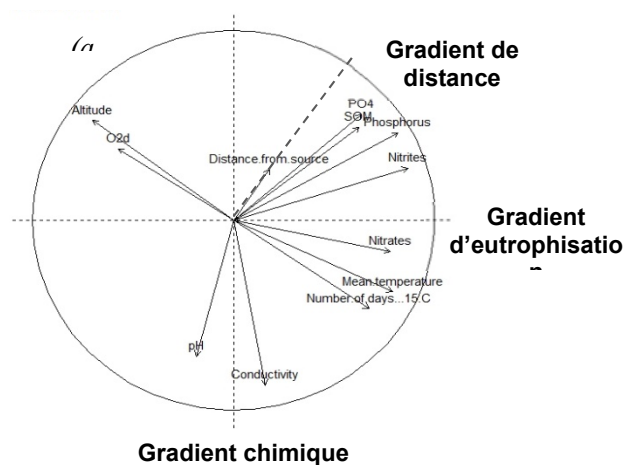


FIGURE 5. Analyse ACP synthétisant les variables environnementales Trois axes expliquant 79% de la variance totale (40%, 25% and 14% respectivement) se dégagent : (1) un axe PC1 de gradient d'eutrophisation (sites de droite très eutrophisés caractérisés par des températures chaudes avec concentrations élevées d'azote, phosphore, Matière Organique en Suspension SOM et faible taux d'oxygène), (2) un axe PC2 de gradient chimique (sites avec pH haut et forte conductivité) et axe PC3 (3) de gradient de distance (sites distants de la source). Tiré du rapport de M2 de Laurine Gouthier.

TABLE 2. Contribution des variables environnementales aux axes. Tiré du rapport de M2 de Laurine Gouthier. Les données sont issues de la base de données SIE Agence de l'Eau sauf pour le nombre de jours >15°C issue des datalogger, grâce au soutien de la Fédération de Pêche de l'Ariège dans le cadre de la thèse d'Eloïse Duval.

	Axis 1 Gradient d'eutrophisation	Axis 2 Gradient chimique	Axis 3 Gradient de distance
Altitude	0.4920	0.2776	0.1152
Distance à la source	0.0311	0.0725	0.6862
Conductivité	0.0247	0.7527	0.0710
SOM	0.3863	0.2417	0.0148
Nitrates	0.6021	0.0263	0.1848
Nitrites	0.7455	0.0761	0.0516
PO ₄	0.4020	0.3123	0.0000
O ₂ d	0.3299	0.1433	0.2275
Phosphore	0.6656	0.2133	0.0002
pH	0.0350	0.5126	0.0084
Nombre de jours > 15°C	0.4489	0.2163	0.1966
Température moyenne	0.6196	0.1408	0.1144

Données préliminaires de pollution métallique

Dans le cadre d'une nouvelle collaboration avec Sophia Hansson, CR CNRS LEFE/ENSAT, et Séverine Jean, une étude pilote a été réalisée en 2021 sur les effets des contaminants métalliques sur la santé des truites. Il s'agit d'une analyse complémentaire du lien entre contaminants métalliques du sédiment et prévalence de l'infection menée par la stagiaire de M2 Johanna Bricout en 2021, coencadrée par L Jacquin et Sophia Hansson (financement pilote Fyssen MULTIFISH et ADI UFT POLLPAT). Les résultats préliminaires de cette étude sont intégrés dans ce rapport technique à des fins de diffusion aux gestionnaires des milieux. Cet axe fera l'objet d'un projet de plus grande ampleur dans les prochaines années financé par la Région Occitanie et le CNRS (thèse Région/UFT et ANR MULTIPAT 2021-2025).

Pour cette partie, seuls les sites avec des données de métaux disponibles dans les stations de mesures AEAG ont été sélectionnés (Fig 6). Au total, 22 populations (sites) ont donc été analysées entre 2016 et 2019 pour la contamination métallique. Les données de contamination métallique de l'eau et des sédiments utilisées dans cette étude ont été extraites de la base de données du Système d'Information sur l'Eau du bassin Adour-Garonne (SIEAG). Neuf métaux ont été sélectionnés dans un premier temps en se basant sur les travaux du doctorant Quentin Petitjean dans le cadre du projet Agence de l'Eau PHYPAT (Petitjean 2019; Petitjean, Jacquin, et al. 2020; Petitjean, Jean, et al. 2020) démontrant leurs effets toxiques sur la physiologie des poissons : l'aluminium (Al), l'arsenic (As), le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le cobalt (Co), le cuivre (Cu), le nickel (Ni), le plomb (Pb) et le zinc (Zn). La région pyrénéenne abritant d'anciennes mines argentifères (Hansson et al. 2017, 2019), l'argent (Ag) a été ajouté à cette sélection. Cependant, étant donné l'hétérogénéité des données disponibles pour les métaux entre les différentes stations de mesures, l'Al et le Zn ont finalement été éliminés. Seuls les métaux présents sur l'ensemble des stations de mesures choisies (donc huit métaux) ont été conservés, afin d'avoir des niveaux de toxicité comparables. Pour chaque site, les stations de mesures situées à moins de 12km ont été utilisées. Les mesures de concentrations métalliques pour chaque site ont été prises sur la période 2015 à 2019, afin de refléter une contamination chronique et sur trois mois (mai, juillet et septembre), afin d'éviter les biais de variabilité saisonnière.

A partir de ces données métalliques, un gradient de contamination métallique dans l'eau et dans les sédiments a été calculé en utilisant l'Unité Toxique ou Toxic Unit (TU) : $TU_{site} = \log \sum_{i=1}^n \frac{Ci}{CL50}$ avec Ci correspondant à la concentration moyenne d'un élément métallique relevé dans le milieu considéré et CL50 correspondant pour chacun des métaux à la concentration létale de 50% de l'espèce choisie. L'intérêt du calcul de cette TU réside dans le fait que les métaux avec la plus grande CL50 ont un plus grand poids lors du calcul de la TU, comme utilisé dans des études précédentes (Petitjean, Jean, et al. 2020). Les valeurs de CL50 (toxicité des métaux) utilisées ont été prises sur la base de données ECOTOX du site USEPA et se sont basées sur les valeurs de CL50 d'un modèle poisson *Pimephales promelas*. En effet, les CL50 pour certains métaux n'étaient pas disponibles chez la truite fario ou la truite arc-en-ciel. L'objectif de cette TU était de pouvoir caractériser un gradient intégratif de contamination métallique des sites (Fig. 6). Dans cette étude, seule la TU des sédiments a finalement été

utilisée (et non celle de l'eau) pour établir le gradient de contamination, en raison de la capacité des sédiments à conserver des polluants pendant de très longues périodes, contrairement à l'eau. La TU sédiment calculée était bien fiable et stable et nous avons vérifié qu'il n'y avait pas de différences entre années (ANOVA, p-value = 0.89).

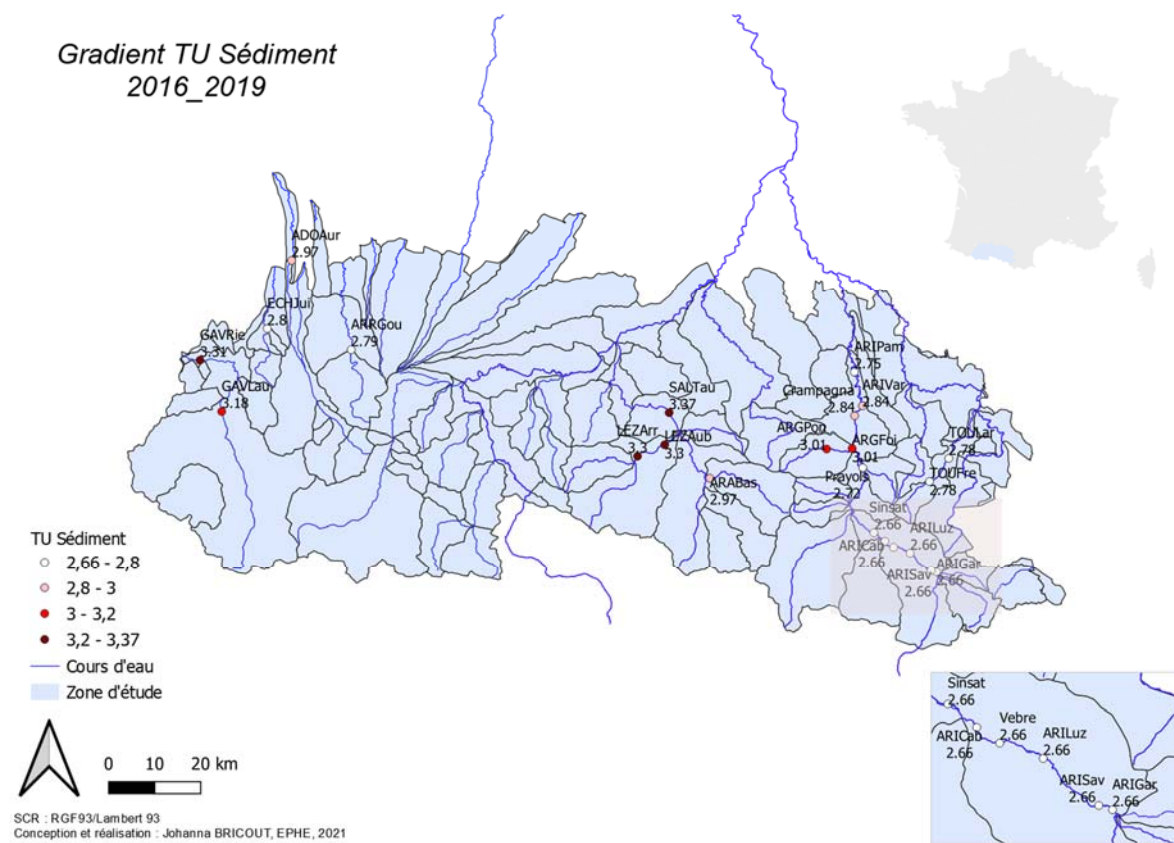


Figure 6 : Représentation spatiale du gradient de contamination métallique des sédiments calculé grâce à la base de données SIE de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne. Les sites les plus contaminés apparaissent en foncé. La TU sédiment (Unité Toxique des sédiments) correspond au niveau de toxicité métallique dans les sédiments (somme des concentrations d'aluminium (Al), arsenic (As), cadmium (Cd), chrome (Cr), cobalt (Co), cuivre (Cu), nickel (Ni), plomb (Pb) et zinc (Zn)/divisés par leur toxicité sur poisson). Tiré du rapport de M2 de Johanna Bricout (Bricout 2021)

Mesures et prélèvements sur poissons

Tous les poissons ont été mesurés pesés et photographiés pour analyses morphologiques. Un prélèvement de sang a été effectué dans la veine caudale en 2018 (seringue Terumo, aiguille Terumo 26G héparinée) pour analyse des marqueurs sanguins. Un échantillon de nageoire pelvienne a été prélevé et stocké dans l'alcool à 96% pour les analyses génétiques. Les poissons ont ensuite été placés dans 1L d'eau minérale pendant 20 minutes pour prélèvement d'urine. La

plupart des poissons ont ensuite été relâchés sauf en 2018 pour dissection et analyse et prélèvement de reins et sexage par le vétérinaire Armand Lautraite.

Détermination de la prévalence de PKD et mise au point de la technique d'ADN urinaire

Sur chacun des sites de 2016 à 2019, la prévalence (présence 1 ou absence 0 du pathogène) de PKD a été mesurée pour chaque individu et au niveau de la population. Pour les individus de 2016 à 2018, la prévalence de PKD a été mesurée à l'aide d'une technique de PCR quantitative (qPCR) sur l'ADN provenant des reins (kDNA), permettant ainsi de quantifier l'ADN du pathogène par le vétérinaire A Lautraite. Pour cela, des amorces ont été utilisées afin d'amplifier la sous-unité 18S de l'ADN ribosomal (ADNr) de *T. bryosalmonae*. Parallèlement la sous-unité 12S de l'ADNr de truite fario a été amplifiée afin de corriger la différence de taille des prélèvements de reins. Pour l'année 2019, la prévalence de PKD a été mesurée quant à elle dans l'urine des truites à l'aide d'une technique non létale par Eloïse Duval (thèse coencadrée par S Blanchet, G Loot et E Quéméré), la méthode « uDNA », afin de détecter la présence de *T. bryosalmonae* de façon non invasive. Cette technique est maintenant validée et publiée (Duval et al. 2021). Sachant que les poissons excrètent les spores des parasites dans l'environnement via leur urine, environ toutes les 20 minutes, les truites ont été placées environ 1h dans des bouteilles contenant un volume d'un litre d'eau non contaminé, afin de récolter leur urine. Après une heure, l'eau a été filtrée directement sur le terrain à l'aide de filtres en nitrate de cellulose stériles Sartorius© de 1.2µm, d'une pompe péristaltique (modèle 410 de Solinst) et de supports de filtration Sartorius. Les filtrats obtenus ont été conservés à -80°C avant d'extraire l'ADN. L'extraction a été réalisée à l'aide du Soil Power kit Qiagen®. Des amorces spécifiques ont été utilisées, afin d'amplifier le fragment ADN 182bp de *T. bryosalmonae* et la sous-unité 18S de l'ADNr. L'amplification a ensuite été répétée via la technique droplet digital PCR (ddPCR), qui consiste à transformer la solution PCR en de nombreuses gouttelettes (environ 20 000) et à dénombrer celles contenant l'ADN du pathogène, qui devenaient fluorescentes en cas d'amplification. Pour chaque truite, une prévalence individuelle a donc été obtenue (0 : pas d'ADN de pathogène, poisson non infecté, 1 : présence d'ADN de pathogène, poisson infecté) (Duval et al. 2021)

Biomarqueurs de santé : ratio N/L, hématocrite et condition corporelle

Sur la majorité des sites de 2016 à 2018, des prises de sang ont été effectuées sur le terrain au niveau de la veine caudale des poissons (les prises de sang n'ont pas pu être effectuées en 2019). A partir de ces échantillons de sang, des frottis sanguins ont été réalisés sur des lames, fixés avec de l'éthanol à 95%, colorés avec du May-Grünwald (pose de 5min) puis du Giemsa (pose de 5min) afin de colorer les cellules sanguines (Fig. 7). Chacune de ces lames ont ensuite été observées au microscope (Nikon Eclipse E200). Au total, 100 leucocytes par lame ont été comptés, en prenant soin de différencier les lymphocytes, les monocytes et les neutrophiles (Fig

7), afin de pouvoir calculer le ratio N/L. Deux observateurs ont lu les lames. Un indice de répétabilité intra-observateur a donc été calculé pour 30 individus (30 lames) pour les années 2017 et 2018, afin de s'assurer que les valeurs de ratio N/L obtenues étaient comparables entre observateurs. La répétabilité obtenue était de 0.71, sachant que 0 correspond à une répétabilité nulle et 1 une répétabilité parfaite. Les ratio N/L obtenus ont donc été considérés comme fiables.

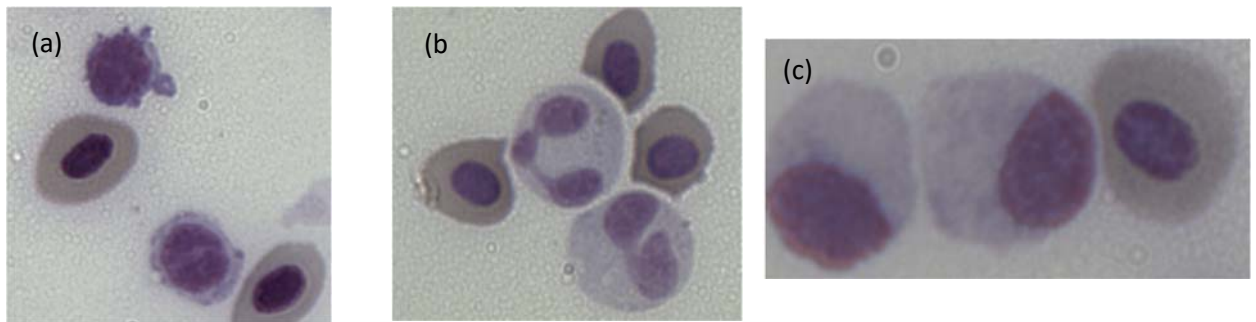


Figure 7 : cellules immunitaires sanguines de truite fario après coloration au May-Grünwald et Giemsa. (a) Lymphocyte : Noyau prédominant, cytoplasme très restreint, projections pseudopodiales du cytoplasme ; (b) Neutrophile : Noyau multilobé (2 à 5 lobes) ; (c) Monocyte : Noyau polarisé avec une forme d'haricots, cytoplasme très pâle et avec un aspect granuleux. Les autres cellules sanguines présentes correspondent à des érythrocytes (globules rouges). Tiré du rapport de Laurine Gouthier (Gouthier 2020).

Concernant l'hématocrite (proportion de globules rouges ou d'érythrocytes dans le sang), il a été mesuré seulement sur certaines populations de truites de 2018. A partir des prises de sang effectuées, plusieurs échantillons de sang ont été centrifugés (3000 rpm pendant 5 min), en vue de séparer le plasma des érythrocytes. Afin de calculer l'hématocrite, la partie correspondant aux érythrocytes a été mesurée à l'aide d'une règle au 10^{ème} de millimètre près puis divisée par la longueur totale de l'échantillon centrifugé (Gouthier 2020) (Fig 8)

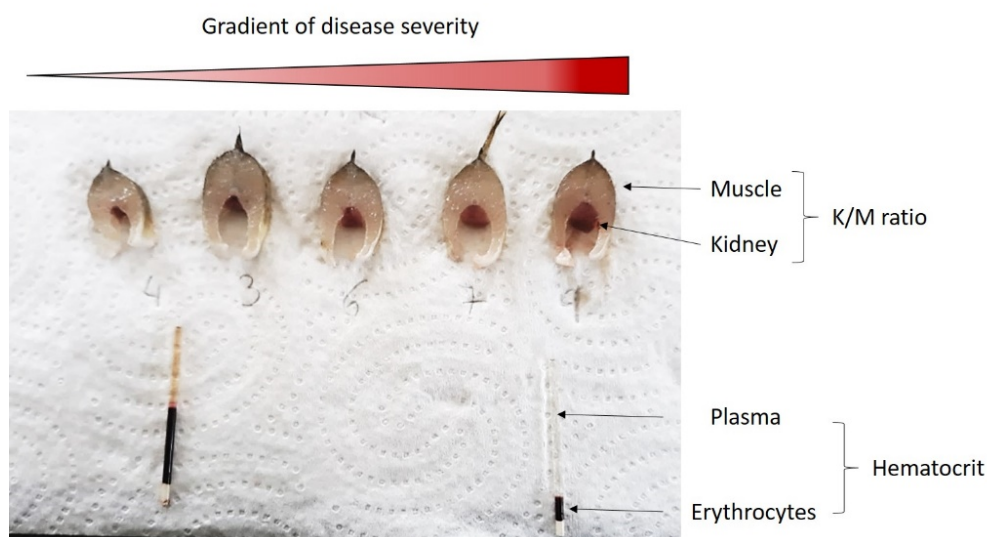


Fig 8. Coupes de reins montrant des signes croissants de gonflement et d'infection des reins (ratio Kidney(rein)/Muscle croissant) de gauche à droite. Le gonflement (hyperplasie) des reins (ratio K/M croissant) est un signe Clinique typique de la PKD. En dessous à gauche un hématocrite normal (proportion d'érythrocytes: globules rouges normal), à droite un hématocrite très faible (proportion d'érythrocytes très faible) typique d'une infection sévère à la PKD causant une anémie sévère. Collaboration avec Armand Lautraite et Laurent Garmendia, M2 de Laurine Gouthier.

En plus de ces deux biomarqueurs sanguins, la taille ainsi que le poids des truites ont été mesurés. A partir de ces mesures, la condition corporelle (ou indice de Fulton) a été calculée ($\text{masse}/\text{taille}^3$), afin de refléter la quantité de réserves énergétiques des individus et donc leur état physiologique.

Analyses génétiques sur SNP (hétérozygotie)

Seules les analyses génétiques préliminaires effectuées par Laurine Gouthier lors de son M2 sont présentées dans ce rapport. Des analyses plus poussées seront effectuées par E Duval dans le cadre de sa thèse et du projet OFB. Un total de 192 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) ont été génotypés pour chaque individu. 170 de ces SNPs sont des SNPs répartis équitablement sur le génome de truite basé sur les travaux de (Saint-Pé et al. 2019). Ces SNPs ont été obtenus par dRAD avec les enzymes de restriction *EcoRI*HF and *MspI* sélectionnés selon leur localisation sur les chromosomes (Saint-Pé et al., 2019). En complément, un ensemble de 22 SNPs “candidats” ont été ajoutés sur la base de leurs effets potentiels sur la résistance ou la tolérance à la PKD basé sur les travaux de (Ahmad et al. 2018). Le génotypage a été effectué par le LGC groupe selon la technique KASPAR (United Kingdom). Grâce à ces données génétiques, un taux d’hétérozygotie individuel a été calculé *et appelé* MLH (MultiLocus Heterozygosity) sur tous les loci, défini par le nombre de loci hétérozygotes divisé par l’ensemble des loci genotype sur cet individu (Coltman et al. 1999). Un MLH de 0.5 signifie donc que 50 % des loci de cet individu sont hétérozygotes. Les MLH ont été calculés grâce au R package *inbreedR* v.0.3.2 (Stoffel et al. 2016). Nous avons aussi utilisé une approche Single Locus Heterozygosity (SLH) pour tester les associations entre genotype individuel et statut d’infection, tolérance, résistance.

Analyses statistiques

Toutes les analyses ont été effectuées sur le logiciel R software (V 3.6.1). Des modèles Mixtes Linéaires Généralisés ont été utilisés (GLMM avec Template Model Builder (TMB) et R package *glmmTMB* v.1.0.1.). Pour tester les effets des variables environnementales (data 2019), sur la prévalence parasitaire, les modèles complets comprenaient comme variables explicatives les 3 axes d’ACP (gradient eutrophisation, gradient chimique, gradient de distance), ainsi que les termes quadratiques pour tester des relations potentiellement non linéaires. La taille et la date de pêche ont été également incluses comme covariables dans les modèles. La population a été incluse en effet aléatoire pour prendre en compte la non indépendance des poissons issus d’une même population selon la structure: $\text{Prevalence} \sim \text{taille} + \text{date} + \text{gradient d'eutrophisation (axis1)} + (\text{axis 1})^2 + \text{gradient chimique (axis 2)} + (\text{axis 2})^2 + \text{gradient de distance (axis3)} + (\text{axis 3})^2 + \text{lithologie} + (1|\text{population})$.

Pour tester les effets de la structure génétique (ici uniquement hétérozygotie MLH) (data 2018), des modèles complets ont été construits pour chaque variable réponse: prévalence (0: non infecté ou 1: infecté, erreur binomiale et logit link fonction), charge parasitaire reflétant la

résistance (gamma error distribution et log link function), hématoците reflétant la tolérance (ajusté selon les résidus de régression haematocyte~charge pour corriger pour une charge parasitaire donnée, distribution gaussienne distribution et identity link fonction). Pour la résistance et tolérance, les modèles n'ont été appliqués que sur les individus infectés. La structure des modèles était comme suit: y (prevalence, resistance or tolerance) $\sim$ sexe + taille + gradient de distance + MLH + MLH² + (1|cohorte) + (1|population). La taille et le sexe ont été ajoutés en covariables. La variable cohorte (≤ 120 mm ou > 120 mm) a été intégrée afin de prendre en compte les différences entre cohortes. La variable population était aussi ajoutée en effet aléatoire pour prendre en compte les similitudes au sein d'une population. Pour l'approche SLH nous avons utilisé la même structure de modèle et testé les associations entre prevalence, tolérance résistance et présence d'allèles particulier pour chaque SNPs candidats basé sur les travaux de (Ahmad et al. 2018). (homozygote pour l'allele *A* or *B* et heterozygote *AB*). Sur les autres SNPs, les SNP monomorphes ou sous représentés ont été exclus. Au total, 118 SNP ont été testé pour la prevalence et 108 pour résistance/tolérance. Des ANOVAs de type III ANOVAs ont été menées avec P values ajustées pour les comparaisons multiples (FDR, (Benjamini et Hochberg 1995) (fonction *p.adjust* fonction R package *stats* v.4.1.0).

Tous les meilleurs modèles ont été sélectionnés par AICc et la fonction *dredge* package *MuMIn* v.1.43.17 (Barton 2019). La multicollinearité a été contrôlée par le variance inflation factor (VIF) (fonction *check_collinearity*, R package *performance* v.0.4.6 (James et al. 2013). Les variables ont été centrées réduites. L'autocorrélation spatiale a été contrôlée également (*correlog* increment de 0.2, implementé dans le R package *ncf* v.1.2-9 (Bjørnstad et al. 1999) et tests d'autocorrélation par Moran's I fonction R package *ape* v.5.3 (Paradis et Schliep 2019), mais aucune autocorrélation spatiale n'a été détectée (test de Moran P=0.8).

RESULTATS

Mise au point de la technique d'ADN urinaire

Ces résultats sont issus du travail de thèse de Eloïse Duval, encadrée par G Loot, S Blanchet, E Quéméré, publiés dans (Duval et al. 2021), grâce au soutien technique de la Fédération de pêche de l'Ariège, et diffusés lors des journées techniques de l'ARPO 2021. En résumé, l'analyse des lésions des reins effectuées par le vétérinaire Armand Lautraite (de 0 à 3, couleurs sur le graphe), ainsi que de l'ADN des reins (kDNA, prévalence indiquée sous les barres) et montre une variation de lésions des reins entre les sites (Fig 9).



Figure 9: Symptômes d'infection (pourcentage des différents scores de lésion des reins) par *T. bryosalmonae* dans 8 sites prélevés en 2018 en Ariège. La prévalence mesurée par l'ADN des reins (%) (kDNA) est indiquée en italique sous les barres dans l'ordre croissant. La taille d'échantillon (nombre de truites utilisées pour la mesure) est indiquée au dessus des barres. On constate qu'un certain nombre de poissons sont asymptomatiques (ADN du pathogène détecté dans les reins, mais signes cliniques faibles-score de 0 ou 1). Tiré de Duval et al. 2021.

De plus, une plus grande prévalence parasitaire a été trouvée avec la détection d'ADN dans les reins (kDNA, 62%) ou dans l'urine (uDNA, ddPCR = 56%) comparé à l'analyse visuelle des lésions du rein (28%, Fig. 2a, post-hoc tests, $P < 0.001$), ce qui signifie que 55% des truites infectées sont en réalité asymptomatiques. La prévalence de *T. bryosalmonae* estimée par uDNA était légèrement moins élevée dans les reins (kDNA (Fig. 2a, Fig 3) que dans l'urine, mais cette différence n'était pas significative en ddPCR (post-hoc test, $P = 0.08$). **La méthode uDNA apporte des résultats fiables de prévalence** (true positives + true negatives) pour **90%** des échantillons (en ddPCR) (Fig. 10).

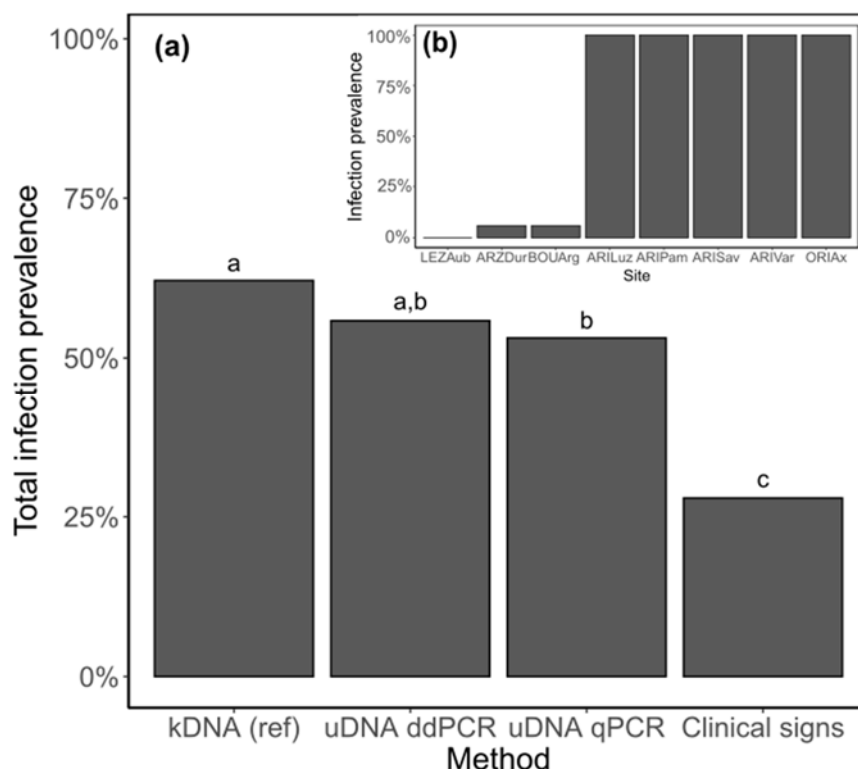


Fig 10. (a) Prévalence de *T. bryosalmonae* mesurée dans les reins par qPCR (kDNA), dans l'urine par ddPCR (uDNA ddPCR) et dans l'urine par qPCR (uDNA qPCR), ainsi que par analyse visuelle des reins (clinical signs). Les résultats montrent l'uDNA est une méthode fiable pour mesurer la prévalence du pathogène comparée à la méthode standard de kDNA. (b) prévalence totale dans chaque site. Tiré de Duval et al. 2021.

En ce qui concerne la charge parasitaire, la quantité d'ADN mesurée dans les reins et dans l'urine était moins forte, et très faible pour les poissons ayant les reins les plus endommagés (score de lésion de 3), ce qui suggère qu'ils excrètent moins d'ADN du pathogène et/ou moins d'urine. Cela suggère également que cette méthode d'ADNurinaire est moins fiable pour mesurer la charge parasitaire par rapport à la prévalence (Duval et al. 2021).

Facteurs environnementaux

Ces résultats sont issus du rapport de M2 de Laurine Gouthier (Gouthier 2020). Une étude à plus large échelle financée par l'OFB dans le cadre de la thèse d'Eloïse Duval est en cours pour dissocier plus précisément les effets de la température et de la qualité de l'eau. Les meilleurs modèles expliquant la prévalence de *T. bryosalmonae* à l'échelle régionale incluent la taille du poisson, le gradient d'eutrophisation (nutriments, température, oxygène, axe 1) et le gradient chimique (conductivité, pH, axe 2) (Table 3, Figure 11). Le pathogène est plus souvent retrouvé dans les sites les plus eutrophisés, caractérisés par des niveaux plus bas d'O₂, et des niveaux plus élevés de température, d'azote, phosphore, matière organique en suspension, et à plus basse

altitude (Fig 11). Les autres variables avaient des effets moindres ou non significatifs. Les termes quadratiques n'ont pas été retenus dans les modèles finaux.

TABLE 3. Meilleurs modèles statistiques (selection par AIC). “–” représente les variables non retenues dans les modèles finaux (rapport de M2 de Laurine Gouthier). Dû à la crise sanitaire, les analyses ont été effectuées sur deux jeux de données différents. Une analyse plus complète sera effectuée dans la thèse d'Eloïse Duval pour confirmer ou infirmer ces résultats.

	Estimate ± SE	Z	P
Analyse des facteurs environnementaux			
Prevalence			
Taille	0.67 ± 0.24	2.78	0.0055 **
Date	0.61 ± 0.49	1.25	0.2129
Eutrophication gradient	2.89 ± 0.73	3.95	< 0.001 ***
Chemical gradient	-0.84 ± 0.59	-1.41	0.1577
Distance gradient	-	-	-
Lithologie	-	-	-
Analyse des facteurs individuels			
Prevalence			
Sex	-	-	-
Taille	1.34 ± 0.45	2.97	0.0030 **
Gradient de distance	7.55 ± 4.98	1.52	0.1297
MLH	-	-	-
Parasite load			
Sex	-	-	-
Body length	-0.44 ± 0.26	-1.69	0.0903
Gradient de distance	-	-	-
MLH	-	-	-
Haematocrit ratio			
Sex	-	-	-
Body length	0.22 ± 0.10		2.20
Upstream-downstream gradient	-	-	-
MLH	-	-	-

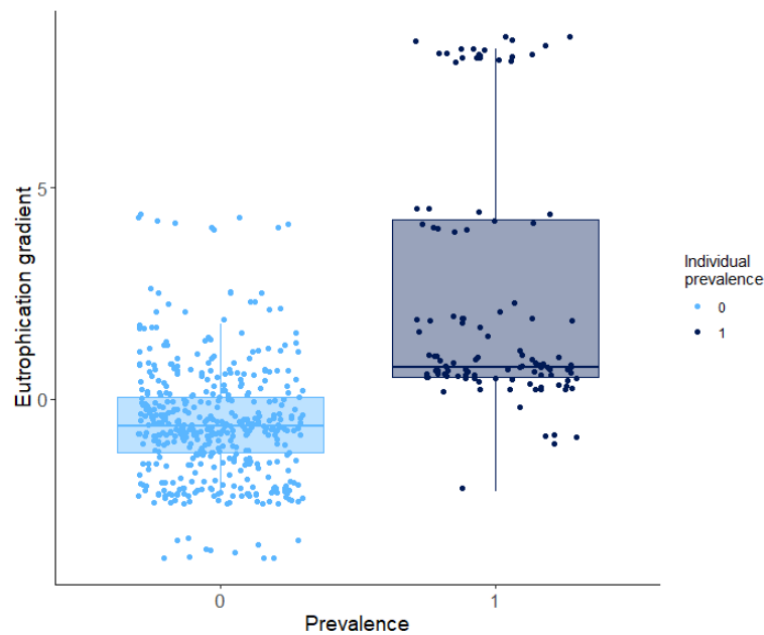


FIGURE 11. lien entre gradient eutrophisation (1er axe d'ACP, voir méthodes) et la prévalence du pathogène (0: individus non infectés, 1: individus infectés). Chaque point représente un individu. Les résultats montrent une prévalence de PKD plus importante dans les sites les plus eutrophisés (niveaux plus élevés de température, SOM, Azote, Phosphore, et O₂ dissous bas). (Gauthier 2020).

Liens potentiels entre PKD, santé et contamination métallique

Contrairement à nos attentes, les modèles statistiques suggèrent qu'il y a moins de truites infectées par la PKD dans les sites dont les sédiments sont les plus contaminés aux métaux (Tab. 4), et ces différences étaient plus marquées chez les poissons juvéniles (Fig 12). Des analyses séparées métal par métal confirment ces résultats pour le cadmium, l'arsenic, le cuivre et le cobalt, dont les fortes concentrations dans les sédiments sont associées à une plus faible prévalence de PKD dans les populations, mais des analyses métalliques plus complètes (notamment dans le sang) sont en cours pour confirmer ou infirmer ces résultats (projet ADI/ANR). En revanche, aucun lien entre la contamination métallique et les autres marqueurs de santé n'ont été trouvés (hématocrite, ratio H/L, condition corporelle, modèles mixtes, $P > 0.05$). Cependant, une des limites de l'étude est que la contamination est déterminée par la concentration dans les sédiments, qui ne reflète pas nécessairement les contaminants présents dans le corps des truites. Des études sont en cours pour déterminer le transfert de contaminants dans les truites elles-mêmes.

Table 4 : Résultats des meilleurs modèles mixtes sélectionnés par AIC pour expliquer la prévalence d'infection à la PKD tous âges confondus, puis des modèles séparés chez les adultes et chez les juvéniles (TU sédiment : Unité Toxique des sédiments, correspondant à la somme de tous les métaux divisés par leur toxicité sur poisson). Tiré du rapport de M2 de Johanna Bricout.

Prévalence	Estimate $\pm$ Std.Error	z-value	p-value
Tous âges confondus			
TU Sédiment	-4.84 ± 1.74	-2.78	0.005 **
Gradient d'eutrophisation	-4.62 ± 1.58	-2.92	0.003 **
Gradient chimique	0.37 ± 1.32	0.28	0.78
Taille	1.75 ± 0.56	3.15	0.002 **
TU Sédiment*Taille	1.16 ± 0.58	2	0.045 *
Chez les adultes			
TU Sédiment	-1.85 ± 1.41	-1.32	0.19
Gradient d'eutrophisation	-0.79 ± 0.91	-0.87	0.38
Gradient chimique	-2.40 ± 2.02	-1.19	0.23
Gradient amont-aval	3.19 ± 1.73	1.84	0.07
Chez les juvéniles			
TU Sédiment	-4.25 ± 1.36	-3.12	0.002 **
Gradient d'eutrophisation	-3.92 ± 1.32	-2.97	0.003 **
Gradient chimique	1.00 ± 0.93	1.07	0.28
Gradient amont-aval	1.30 ± 1.20	1.08	0.28

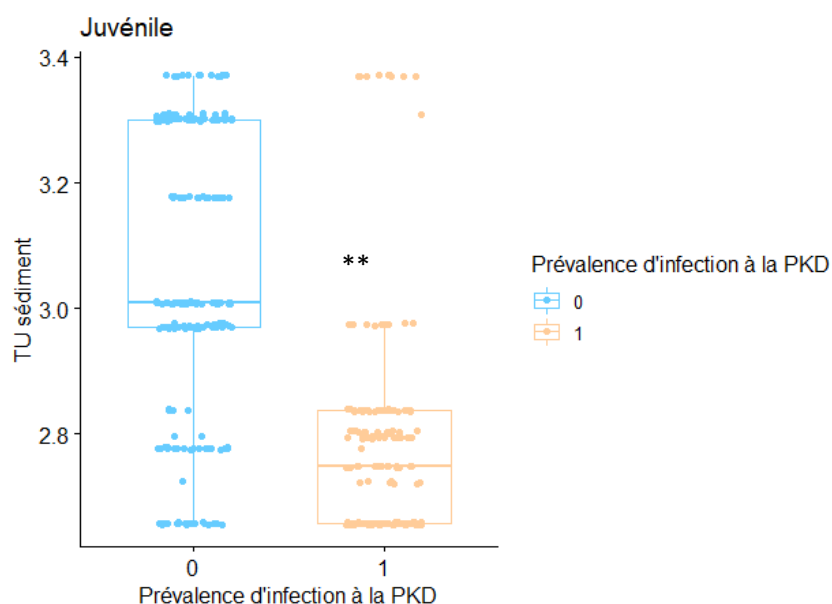


Figure 12 : lien entre la contamination métallique (TU sédiment : Unité Toxique des sédiments, correspondant à la somme de tous les métaux divisés par leur toxicité sur poisson) et la prévalence d'infection à la PKD (0 = individu non infecté ; 1 = individu infecté) chez les juvéniles. Chez les juvéniles, le nombre d'individus infectés par la PKD était significativement plus élevé dans les sites les moins pollués (Glmer : p-value $\approx$ 0.002, indiqué par une astérisque). Tiré du rapport de M2 de Johanna Bricout.

Facteurs individuels: hétérozygotie et SNP candidats

L'hétérozygotie n'avait pas d'effet sur la résistance et tolérance des truites à la PKD. En effet ni l'hétérozygotie globale (MLH) ou locale au niveau des loci (SLH) n'étaient associés à des différences de prévalence, charge parasitaire ou hématokrite chez les truites (Table 3). Seule la taille expliquait les différences de prévalence. De plus, aucune association n'a été trouvée entre les SNP candidats et les variables parasitaires (Fig 13).

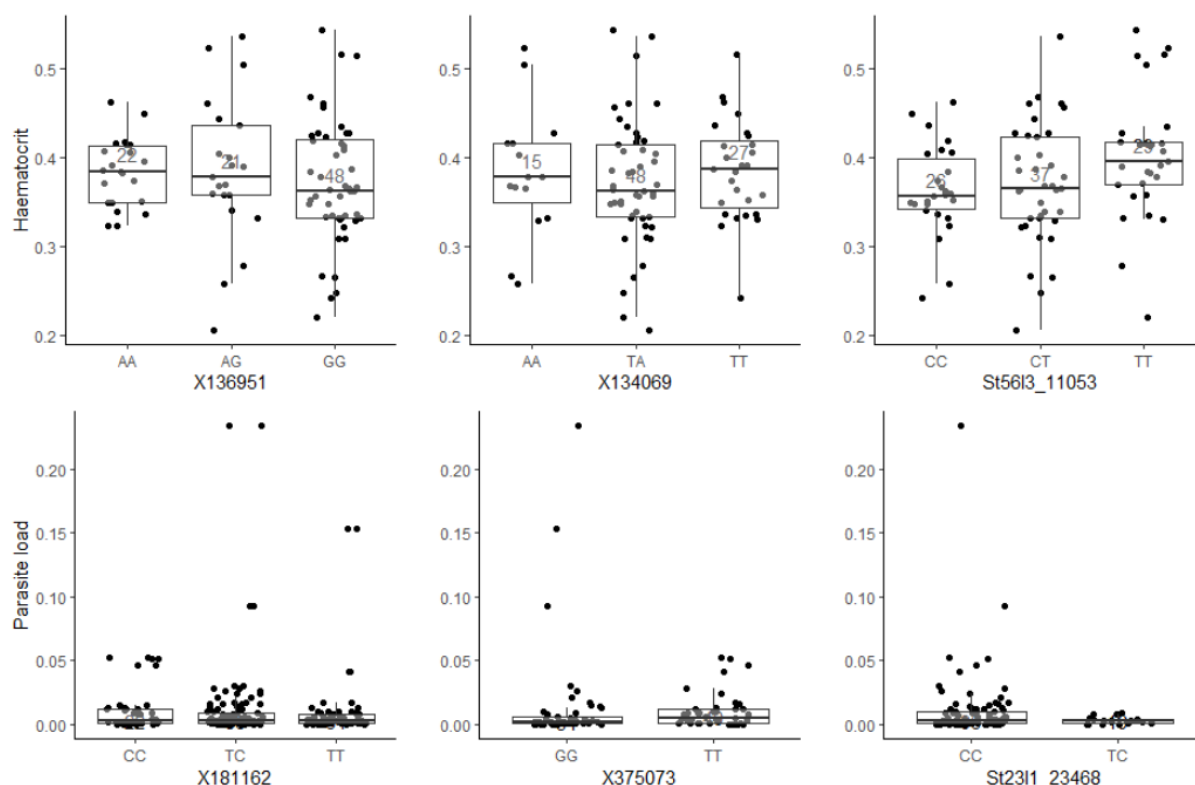


FIGURE 13 tolérance au pathogène (reflété par l'hématocrite) ou leur résistance (reflété par la charge parasitaire) en fonction de l'identité de leurs allèles sur certains SNPs "candidats" (sélectionnés selon Ahmad et al. 2018). Pour chaque locus, les allèles sont donc indiqués sur les figures en abscisse. Chaque point représente un individu. Aucune association n'a été trouvée entre génotype et tolérance ou résistance dans cette étude préliminaire issue du rapport de M2 de Laurine Gouthier. Ces résultats seront confirmés ou infirmés par la thèse d'Eloïse Duval à plus large échelle géographique. Tiré du rapport de M2 de Laurine Gouthier.

Discussion

Technique de détection du pathogène (ADN urinaire)

Le premier objectif de l'étude était de tester une **méthode de détection non létale du pathogène** *Tetracapsuloides bryosalmonae* dans l'urine de truite, sur la base de techniques d'ADN environnemental (ADNu pour ADN urinaire). Cette partie a été conduite dans le cadre de la thèse d'Eloïse Duval co-encadrée par G Loot, S Blanchet et E Quéméré. Les résultats montrent que la technique est efficace pour détecter la présence du pathogène dans l'urine du poisson, et donc de mesurer la **prévalence parasitaire** de façon non invasive à partir de l'urine (comparaison avec la technique standard d'ADNk, correspondant à la détection de l'ADN dans le rein du poisson après dissection), notamment si la technique de ddPCR est utilisée (meilleure sensibilité). En revanche la quantification de l'ADNu pour mesurer la charge parasitaire était plus variable entre sites, possiblement car les poissons ayant les reins les plus endommagés (signes cliniques importants) excrétaient moins d'urine. Les techniques d'ADNu et de détection visuelle des signes cliniques donnent donc des résultats complémentaires. Dans tous les cas, cette technique d'**ADN urinaire**, publiée récemment dans le journal *Environmental DNA* (Duval et al. 2021) et diffusée lors des journées techniques de l'ARPO, a donc bien été validée par cette étude pour effectuer des suivis non invasifs de prevalence parasitaire chez les truites. Cette technique sera donc utilisée à plus large échelle géographique pour la suite du projet, car elle permet de limiter les euthanasies de poissons et d'amplifier les campagnes d'échantillonnage sans impacter les populations sauvages dans le cadre des projets suivants OFB et ANR. De plus, cette technique permet également de mesurer le **potentiel de transmission** de chaque individu, puisque l'ADN urinaire reflète la **capacité effective du poisson à excréter** et donc transmettre la pathogène *T bryosalmonae* dans l'eau et aux bryozoaires, l'hôte final du pathogène. Il s'agit donc d'une **technique innovante non létale** prometteuse pour mieux comprendre les dynamiques épidémiques et les interactions truites-pathogène à large échelle et de façon compatible avec les objectifs de bien-être animal et de préservation de la biodiversité aquatique.

Facteurs environnementaux: eutrophisation

Le deuxième objectif de l'étude était de tester les effets de certains **facteurs environnementaux** sur la prévalence du pathogène, dans le cadre du stage de M2 de Laurine Gouthier. Ces travaux préliminaires donneront lieu à une étude de plus grande ampleur dans le cadre de la thèse d'Eloïse Duval et du projet PKD financé par l'OFB qui confirmeront ou infirmeront ces résultats. Les résultats du Master de Laurine Gouthier montrent dans un premier temps que la prevalence du pathogène est **plus élevée dans les sites les plus eutrophisés**, caractérisés par des niveaux plus bas d'O₂, et des niveaux plus élevés de température, azote, phosphore, matière organique en suspension, souvent situés à plus basse altitude (Gouthier 2020). Des études précédentes ont exploré l'effet de la température qui pourrait favoriser le relargage des spores par le bryzoaire (Okamura et al. 2011), bien que le seuil de 15°C fréquemment cite soit remis en cause par des études récentes (Garmendia 2017b). L'eutrophisation de l'eau semble favoriser la présence du

pathogène chez la truite, ce qui est cohérent avec la littérature, bien que les mécanismes sous-jacents restent à explorer (Carraro et al. 2016, 2017; Okamura et al. 2011). En effet dans notre étude il n'était pas possible de dissocier les effets de la température et de la qualité de l'eau. Une hypothèse plausible serait que la concentration plus élevée de nutriments dans l'eau en site eutrophisé puisse favoriser la présence du bryzoaire (Carraro et al. 2017), ce qui augmenterait la présence de spores dans l'eau et donc le risque d'infection pour les poissons. Des études d'ADN environnemental en cours permettront de tester cette hypothèse en mesurant l'ADN de bryzoaire dans l'eau dans le cadre du projet OFB et la thèse d'Eloïse Duval.

Facteurs génétiques: hétérozygotie et SNPs candidats

En ce qui concerne les facteurs individuels on s'attendait à une meilleure résistance ou tolérance des poissons ayant un niveau d'hétérozygotie plus élevé (Becker et al. 2020; S. Blanchet, Rey, et Loot 2010; Simon Blanchet et al. 2009; Cardon et al. 2011). Cependant, les résultats ne montrent **pas de lien particulier entre niveau d'hétérozygotie** à l'échelle globale du génome (MLH) ou à l'échelle locale (SLH) et la prévalence ou charge parasitaire. En revanche les structures génétiques (marqueurs génétiques neutres et non neutres) des populations de truites était fortement liées au **gradient amont-aval** (Gouthier et al. publication en cours de rédaction pour soumission dans le journal *Diversity*). Cependant, **aucune association entre infection et SNP candidats** n'a été trouvée, contrairement à d'autres études (Ahmad et al. 2018). Ces résultats pourraient être dû à un faible nombre de loci étudiés (118 SNP pour la prévalence, 108 SNP pour la résistance/tolérance). Une autre explication pourrait être liée à des différences de **pression de sélection** entre nos sites d'étude (Bruneaux et al. 2017). Des études génétiques à plus large échelle ainsi que sur les gènes de l'**immunité du CMH** avant et après épisode de sélection naturelle par le pathogène sont prévues afin d'explorer de façon plus approfondie les facteurs génétiques potentiellement impliqués dans les interactions truite-pathogène (thèse d'Eloïse Duval, projet OFB).

Perspectives: contaminants métalliques et interactions truite-pathogène

Enfin, une étude pilote a permis de commencer à explorer les liens entre **contamination métallique** historique issue d'activités minières anciennes et santé des truites, dans le cadre d'une nouvelle collaboration avec la biogéochimiste Sophia Hansson, CR CNRS LEFE/ENSAT et du Master 2 de Johanna Bricout, stagiaire EPHE (financement Fyssen et ADI UFT) (Bricout 2021). La contamination métallique des sédiments a été estimée à partir des données de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne (portail SIE) pour obtenir une Unité intégrative de Toxicité (Toxic Unit TU), qui représente un niveau de toxicité intégratif pour les poissons. Les sites ont été classés par gradient de TU dans les sédiments. Les niveaux de contamination des sédiments étaient globalement peu élevés mais contrastés, et les résultats montrent que la **prévalence du pathogène était plus faible dans les sites dont les sédiments sont les plus riches en métaux**, contrairement à nos attentes. De plus, **aucun effet de la contamination sur les biomarqueurs d'état de santé** des truites (ratio H/L, hématocrite, condition corporelle) n'a été détecté. Ces

résultats ne soutiennent donc pas notre hypothèse initiale d'une immunodépression des poissons par les contaminants métalliques, ni d'une plus grande sensibilité des truites au pathogène en milieu plus contaminé. Il est ainsi possible que les contaminants impactent également négativement le pathogène et/ou le bryzoaire, qui sont également des organismes sensibles aux substances toxiques. Cependant cette hypothèse reste à tester, et cette **étude pilote présente deux limites**: le gradient de contamination était assez faible (niveaux de contamination faible), et le niveau de contamination était calculé à partir des sédiments et non des poissons eux-même. Il reste donc à déterminer la façon dont les contaminants environnementaux sont transférés ou non dans les tissus des poissons. Une étude pilote à partir du sang est en cours (projet UFT POLLPAT piloté par Sophia Hansson). De plus, la sélection naturelle qui a pu éliminer les poissons les plus impactés avant notre échantillonnage. Un financement ANR et une thèse Région/UFT ont donc été acquis pour explorer plus précisément les effets des **contaminants métalliques historiques issus d'activités minières anciennes** sur la dynamique des interactions truite-*T. bryosalmonae* à plus large échelle géographique (thèse Région Occitanie/UFT de Laurine Gouthier co-encadrée par Sophia Hansson, L. Jacquin and G. Loot).

Conclusion

En conclusion, cette étude co-financée par l'Agence de l'Eau, l'OFB et l'Université Paul Sabatier, a permis de mettre au point une **technique innovante de détection** du pathogène *Tetracapsuloides bryosalmonae* dans les urines de truite (thèse d'Eloïse Duval), ce qui permet d'effectuer des suivis sanitaires de prévalence parasitaire à large échelle géographique tout en limitant les impacts sur les populations naturelles de truites (Duval et al. 2021). De plus, **l'exploration pilote des facteurs environnementaux et individuels** suggère que la **qualité de l'eau joue un rôle central** dans la **dynamique des interactions** poissons-pathogène. En effet, **l'eutrophisation** de l'eau était associée à une plus forte prévalence du pathogène (Gouthier 2020), tandis que la **contamination métallique** des sédiments est plutôt associée à une moindre prévalence (Bricout 2021). Ces résultats soulignent la complexité des interactions poissons-pathogènes, et des études complémentaires analysant la présence du bryzoaire (ADN environnemental) sont prévues pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents. En revanche, aucun effet des variables génétiques n'a été détecté pour l'instant (hétérozygotie, SNP candidats). Des études à plus large échelle sont en cours pour tester plus spécifiquement les effets des facteurs environnementaux et individuels dans les mêmes populations (projet OFB PKD et ANR MULTIPAT), et mieux comprendre le déterminisme des dynamiques épidémiques dans les populations sauvages de truites.

Remerciements

Cette étude a été effectuée grâce au soutien financier de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne et de l'Université Paul Sabatier, ainsi qu'au soutien logistique et technique de la Fédération de pêche de l'Ariège que nous remercions. Des financements de l'OFB (PKD), la fondation Fyssen (MULTIFISH) et l'Université Fédérale de Toulouse (POLLPAT), ont permis d'étendre le projet à plus large échelle (en cours). Nous remercions la Fédération de pêche de l'Ariège, ainsi que l'ensemble des collaborateurs ayant copiloté ou participé à ce projet à différents niveaux (dans l'ordre alphabétique): Simon Blanchet, Johanna Bricout, Jessica Côte, Myriam Cousseau, Eloïse Duval, Laurent Garmendia, Laurine Gouthier, Sophia Hansson, Armand Lautraite, Géraldine Loot, Séverine Jean, Annie Perrault, Quentin Petitjean, Nicolas Poulet, Erwan Quéméré, Jean-Pierre Rebillard, Margaux Saüt, Loïc Tudesque, Charlotte Veyssière, Allan Yotte.

Références

- Ahmad, F., P. V. Debes, G. Palomar, et A. Vasemägi. 2018. « Association Mapping Reveals Candidate Loci for Resistance and Anaemic Response to an Emerging Temperature-Driven Parasitic Disease in a Wild Salmonid Fish ». *Molecular Ecology* 27(6): 1385-1401.
- Altizer, S. et al. 2013. « Climate Change and Infectious Diseases: From Evidence to a Predictive Framework ». *Science* 341(6145): 514-19.
- Barton, Kamil. 2019. « MuMIn: Multi-Model Inference ».
- Becker, G. M. et al. 2020. « Genome-Wide Association Study to Identify Genetic Loci Associated with Gastrointestinal Nematode Resistance in Katahdin Sheep ». *Animal Genetics* 51(2): 330-35.
- Benjamini, Yoav, et Yosef Hochberg. 1995. « Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing ». *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57(1): 289-300.
- Bettge, K. et al. 2009. « Proliferative Kidney Disease (PKD) of Rainbow Trout: Temperature- and Time-Related Changes of Tetracapsuloides Bryosalmonae DNA in the Kidney ». *Parasitology* 136(6): 615-25.
- Bjørnstad, Ottar N. et al. 1999. « Spatial Population Dynamics: Analyzing Patterns and Processes of Population Synchrony ». *Trends in Ecology & Evolution* 14(11): 427-32.
- Blanchet, S., O. Rey, et G. Loot. 2010. « Evidence for Host Variation in Parasite Tolerance in a Wild Fish Population ». *Evolutionary Ecology* 24(5): 1129-39.
- Blanchet, Simon et al. 2009. « Evidence of Parasite-Mediated Disruptive Selection on Genetic Diversity in a Wild Fish Population ». *Molecular Ecology* 18(6): 1112-23.
- Bricout, Johanna. 2021. « Effets des contaminants métalliques sur les interactions truite-pathogène ». *Rapport de Master 2 de l'EPHE*.

- Bruneaux, Matthieu et al. 2017. « Parasite Infection and Decreased Thermal Tolerance: Impact of Proliferative Kidney Disease on a Wild Salmonid Fish in the Context of Climate Change ». *Functional Ecology* 31(1): 216-26.
- Cardon, Maxime, Géraldine Loot, Gaël Grenouillet, et Simon Blanchet. 2011. « Host Characteristics and Environmental Factors Differentially Drive the Burden and Pathogenicity of an Ectoparasite: A Multilevel Causal Analysis ». *Journal of Animal Ecology* 80(3): 657-67.
- Carraro, Luca et al. 2016. « An epidemiological model for proliferative kidney disease in salmonid populations ». *Parasites & Vectors* 9: 487.
- . 2017. « Integrated Field, Laboratory, and Theoretical Study of PKD Spread in a Swiss Prealpine River ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(45): 11992-97.
- Clifton-Hadley, R. S., D. Bucke, et R. H. Richards. 1987. « A Study of the Sequential Clinical and Pathological Changes during Proliferative Kidney Disease in Rainbow Trout, *Salmo Gairdneri* Richardson ». *Journal of Fish Diseases* 10(5): 335-52.
- Clifton-Hadley, R. S., R. H. Richards, et D. Bucke. 1986. « Proliferative Kidney Disease (PKD) in Rainbow Trout *Salmo Gairdneri*: Further Observations on the Effects of Water Temperature ». *Aquaculture* 55(3): 165-71.
- Clifton-Hadley, R. S., R. H. Richards, et D. Bucke. 1987. « Further Consideration of the Haematology of Proliferative Kidney Disease (PKD) in Rainbow Trout, *Salmo Gairdneri* Richardson ». *Journal of Fish Diseases* 10(6): 435-44.
- Coltman, David W., Jill G. Pilkington, Judith A. Smith, et Josephine M. Pemberton. 1999. « Parasite-Mediated Selection Against Inbred Soay Sheep in a Free-Living Island Population ». *Evolution* 53(4): 1259-67.
- Côte, Jessica et al. 2021. « Urbanisation and Eutrophication as Drivers of Morphological and Physiological Divergence among Riverine Fish Populations ». *Freshwater Biology* 66(4): 669-82.
- Dash, Megha, et Anti Vasemägi. 2014. « Proliferative Kidney Disease (PKD) Agent Tetracapsuloides Bryosalmonae in Brown Trout Populations in Estonia ». *Diseases of Aquatic Organisms* 109(2): 139-48.
- Duval, Eloïse et al. 2021. « Urine DNA (UDNA) as a Non-Lethal Method for Endoparasite Biomonitoring: Development and Validation ». *Environmental DNA* 3(5): 1035-45.
- Garmendia, Laurent. 2017a. « Diagnostic de l'état des populations de truites fario de la rivière Ariège entre Tarascon et Ax-les-Thermes ». *Rapport Agence de l'Eau Adour-Garonne, Fédération de Pêche de l'Ariège, Conseil Départemental Ariège*: 44.
- . 2017b. « Diagnostic thermique des rivières Ariège-Oriège-Lauze ». *Rapport Agence de l'Eau Adour-Garonne, Fédération de Pêche Ariège, Conseil Départemental Ariège*.
- Gouthier, Laurine. 2020. « Individual and environmental drivers of infection by an emerging parasite in brown trout (*Salmo trutta*) populations ». *Master's thesis*.
- Hansson, Sophia V. et al. 2017. « Atmospheric and Terrigenous Metal Accumulation over 3000 Years in a French Mountain Catchment: Local vs Distal Influences ». *Anthropocene* 19: 45-54.

- . 2019. « Legacy Pb Pollution in the Contemporary Environment and Its Potential Bioavailability in Three Mountain Catchments ». *Science of The Total Environment* 671: 1227-36.
- Hartikainen, Hanna, et Beth Okamura. 2015. « Ecology and Evolution of Malacosporean-Bryozoan Interactions ». In *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*, éd. Beth Okamura, Alexander Gruhl, et Jerri L. Bartholomew. Cham: Springer International Publishing, 201-16. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14753-6_11 (6 janvier 2020).
- Hedrick, R. P., E. MacConnell, et P. de Kinkelin. 1993. « Proliferative Kidney Disease of Salmonid Fish ». *Annual Review of Fish Diseases* 3: 277-90.
- Jacquín, Lisa et al. 2017. « Etat de santé de populations de truites fario *Salmo trutta* à Ax-les-Thermes ». *Rapport AX1 Agence de l'Eau Adour-Garonne et Université Paul Sabatier*.
- . 2018. « Marqueurs physiologiques d'état de santé de populations de truites farios en Ariège ». *Rapport du projet AX2, Agence de l'Eau Adour-Garonne et Université Paul Sabatier*.
- James, Gareth, Daniela Witten, Trevor Hastie, et Robert Tibshirani, éd. 2013. *An Introduction to Statistical Learning: With Applications in R*. New York: Springer.
- Kahn, Laura H. 2017. « Perspective: The One-Health Way ». *Nature* 543(7647): S47-S47.
- Lautraite, Armand. 2017. « Rapport d'étude de la tétracapsuloïdose (« PKD ») infectant les truites fario dans le réseau hydrographique de la région d'Ax-Les-Thermes (Ariège, Oriège, Lauze) ».
- Lê, Sébastien, Julie Josse, et François Husson. 2008. « FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis ». *Journal of Statistical Software* 25(1): 1-18.
- Okamura, Beth, Hanna Hartikainen, Heike Schmidt-Posthaus, et Thomas Wahli. 2011. « Life Cycle Complexity, Environmental Change and the Emerging Status of Salmonid Proliferative Kidney Disease ». *Freshwater Biology* 56(4): 735-53.
- Paradis, Emmanuel, et Klaus Schliep. 2019. « Ape 5.0: An Environment for Modern Phylogenetics and Evolutionary Analyses in R ». *Bioinformatics* 35(3): 526-28.
- Pella, Hervé, Jérôme Lejot, Nicolas Lamouroux, et Ton Snelder. 2012. « Le réseau hydrographique théorique (RHT) français et ses attributs environnementaux ». *Géomorphologie : relief, processus, environnement* 18(vol. 18-n° 3): 317-36.
- Petitjean, Quentin. 2019. *Variability of responses to multiple stressors in fish*. Thèse de l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier.
- Petitjean, Quentin, Séverine Jean, et al. 2020. « Direct and Indirect Effects of Multiple Environmental Stressors on Fish Health in Human-Altered Rivers ». *Science of The Total Environment* 742: 140657.
- Petitjean, Quentin, Lisa Jacquín, et al. 2020. « Intraspecific Variability of Responses to Combined Metal Contamination and Immune Challenge among Wild Fish Populations ». *Environmental Pollution*: 116042.
- QGIS Development Team . 2008. « QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org> ».

- Rubin, Aurélie et al. 2019. « Keeping an Eye on Wild Brown Trout (*Salmo Trutta*) Populations: Correlation Between Temperature, Environmental Parameters, and Proliferative Kidney Disease ». *Frontiers in Veterinary Science* 6.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2019.00281/full#B13> (7 janvier 2020).
- Saint-Pé, Keoni et al. 2019. « Development of a large SNPs resource and a low-density SNP array for brown trout (*Salmo trutta*) population genetics ». *BMC Genomics* 20(1): 582.
- Schmidt-Posthaus, Heike, Regula Hirschi, et Ernst Schneider. 2015. « Proliferative kidney disease in brown trout: infection level, pathology and mortality under field conditions ». *Diseases of Aquatic Organisms* 114(2): 139-46.
- Sterud, Erik et al. 2007. « Severe Mortality in Wild Atlantic Salmon *Salmo Salar* Due to Proliferative Kidney Disease (PKD) Caused by *Tetracapsuloides Bryosalmonae* (Myxozoa) ». *Diseases of Aquatic Organisms* 77(3): 191-98.
- Stoffel, Martin A. et al. 2016. « InbreedR: An R Package for the Analysis of Inbreeding Based on Genetic Markers ». *Methods in Ecology and Evolution* 7(11): 1331-39.
- Sudhagar, Arun, Gokhlesh Kumar, et Mansour El-Matbouli. 2020. « The Malacosporean Myxozoan Parasite *Tetracapsuloides Bryosalmonae*: A Threat to Wild Salmonids ». *Pathogens* 9(1): 16.
- Wahli, T et al. 2002. « Proliferative kidney disease in Switzerland: current state of knowledge ». *Journal of Fish Diseases* 25(8): 491-500.