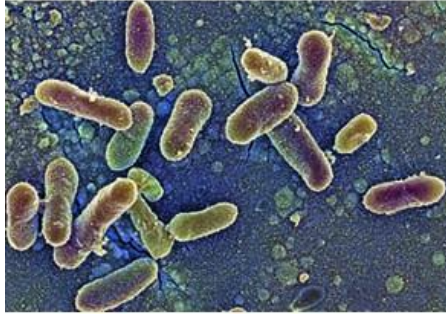


Identification de bactéries cultivables associées aux lésions de carapace de la Cistude d'Europe, *Emys orbicularis*



Nicole Cotte-Pattat

Microbiologie,

Adaptation et Pathogénie

MAP

UMR5240

Anthony Olivier

Arthur de France

La Tour du Valat



Bactéries phytopathogènes en milieux aquatiques

Réservoir pour certaines bactéries **phytopathogènes** ?

Diversité des bactéries de la famille des *Pectobacteriaceae* présentes dans l'eau.



Premières études réalisées dans la Dombes



puis en Isère



En Camargue ?



Dickeya
sur
endive

Présence de lésions sur les carapaces de cistudes

Implication de bactéries dans la formation de telles lésions ?



Lésions sur le plastron

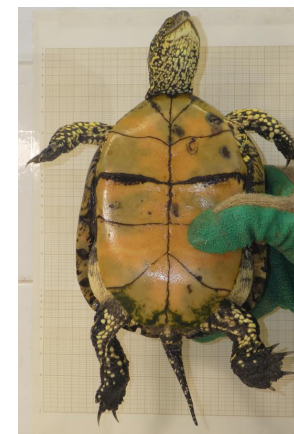


Lésions sur la dossière

Captures des cistudes et prélèvements microbiens

17 cistudes capturées à J0 ou J-1

- 13 présentent des lésions de carapaces (10 femelles, 3 mâles)
76% (1 au stade 2, 6 au stade 3, 6 au stade 4)
- 4 sont indemnes de lésion visible (2 femelles, 2 mâles)
24% (3 au stade 2, 1 au stade 3)



29 prélèvements pour analyse microbiologique

- 4 échantillons d'eau (sites de capture)
- 4 de carapaces de tortues indemnes (plastron + dossière)
- 21 lésions (15 de plastron + 6 de dossière)



Bilan des captures des cistudes et des prélèvements réalisés

N°prlvt	Date capture	Station	N° cistude	sexe	stade	Prélèvements	observations
1	19/05/2021	Esquineau mare	990	mâle	2	Plastron + dossière	Indemne de lésion
2	20/05/2021	Roubine Esquineau nord verveux est	1190	femelle	2	Plastron + dossière	Indemne de lésion
3	20/05/2021	Roubine Esquineau est	1435	mâle	2	Plastron + dossière	Indemne de lésion
4	20/05/2021	Esquineau marais 4	1089	femelle	3	Plastron + dossière	Indemne de lésion
5a	19/05/2021	Esquineau marais des iris	143	femelle	4	1 lésion plastron G	
5b						1 lésion plastron D	
6	19/05/2021	Esquineau marais 4	300	femelle	4	1 lésion plastron	réseau de lésions brun rouge
7a	19/05/2021	Esquineau marais 4	1297	femelle	3	1 lésion plastron G	
7b						1 lésion plastron D	
8	19/05/2021	Roubine Esquineau nord verveux ouest	1205	femelle	2	1 lésion plastron	large peu profonde
9a	19/05/2021	Esquineau marais 5	174	femelle	4	1 lésion bord plastron	grosse lésion profonde
9b						1 lésion dossière	grosse lésion profonde
10a	19/05/2021	Esquineau marais 5	234	femelle	1	2 lésions bord plastron	grosse et profonde
10b						1 lésion plastron	grosse et profonde
11a	19/05/2021	Esquineau mare	375	femelle	3	2 lésions plastron	
11b						2 lésions dossière	
12	19/05/2021	Esquineau marais 4	811	femelle	3	plusieurs lésions plastron	peu profondes
13	20/05/2021	Esquineau marais des iris	331	femelle	4	plusieurs lésions plastron	étalées peu profondes
14a	20/05/2021	Esquineau marais 3	45	femelle	4	plusieurs lésions plastron	
14b						plusieurs lésions dossière	
15a	20/05/2021	Esquineau ouest	885	mâle	3	1 lésion dossière	pas de lésion sur le plastron
15b						1 lésion dossière	
16	20/05/2021	Faisses Garcines sud	575	mâle	3	plusieurs lésions plastron	
17a	20/05/2021	Esquineau marais 4	1322	mâle	3	plusieurs lésions plastron	
17b						plusieurs lésions dossière	
E1	20/05/2021	Esquineau mare				Eau	
E2	20/05/2021	Esquineau marais 4				Eau	
E3	20/05/2021	Roubine Esquineau nord				Eau	
E4	20/05/2021	Garcines sud				Eau	

Cistudes indemnes de lésions

Femelles (F1089, F1190)

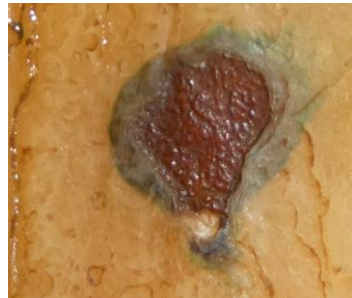
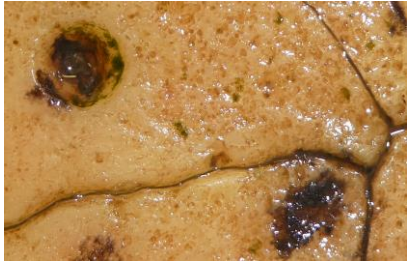


Males (M990, M1435)



Exemples de lésions analysées

Lésions sur le plastron



sur la dossière



Nombre d'individus
présentant des lésions (et %)

Captures: 17 individus

Plastron	dont seult plastron
12 ind (72%)	8 ind (47%)

Dossière	dont seult dossière
5 ind (30%)	1 ind (6%)

Plastron + dossière

4 ind (24%)	
-------------	--

Indemnes

4 ind (24%)	
-------------	--

Mesure de la taille des lésions analysées



Taille des lésions utilisées pour les prélèvements: de 2,46 jusqu'à 39,59 mm !

Méthodologie

Prélèvements

Ecouvillon stérile frotté sur la lésion
Placé dans 1 ml d'eau stérile



Croissance des bactéries

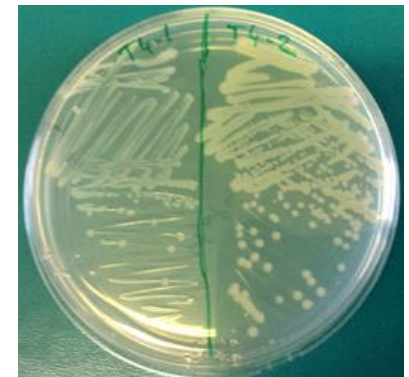
Après 24 h, gamme de dilutions et étalement sur milieu complet
Incubation à 30°C pour 48-72 h
→ Observation de différents types de **bactéries cultivables**



Isolement

Reprise de colonies d'aspects différents
Isolement jusqu'à obtention de colonies isolées
→ **cultures pures**

Nécessaires pour l'**identification** de ces bactéries



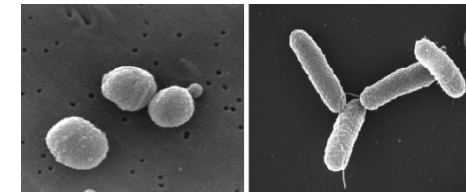
Identification des bactéries

Critères morphologiques et phénotypiques

Observation macroscopique : aspect des colonies sur milieu gélosé en boîte de Petri (couleur, taille, aspect...)

Observation microscopique: morphologie des cellules (forme, groupement ...)

Propriétés biochimiques : capacité à assimiler certains composés ou à produire certaines enzymes ou molécules.



Galerie d'identification API 20E



Présence d'enzymes, voies métaboliques

Assimilation de sucres

Développé pour l'identification de bactéries d'intérêt médical

Identification des bactéries

Critères moléculaires, génétiques-génomiques

Méthodes récentes basées sur les **séquences ADN** des **génomés** bactériens ou de **gènes conservés** (ARN ribosomal 16S ou divers gènes « maison »).

La **comparaison** des séquences avec des **banques de données** permet une identification précise au niveau du genre et de l'espèce (ou la mise en évidence de nouvelles espèces).

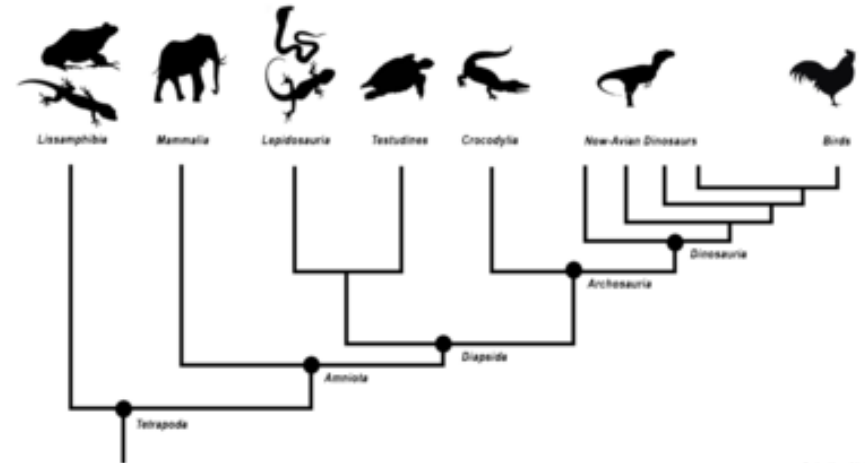
La **phylogénie** permet de construire des **arbres de vie** et de comprendre l'évolution des espèces.

→ **Méthodes très utiles pour l'identification des bactéries environnementales**

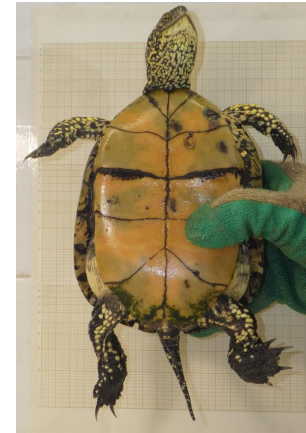
Comparaison des séquences ADN d'un même gène chez différents animaux

Bœuf	cagaaactgcagattagcgtgtatatttatctgtttatgct
Cheval	cagaaactgcagattagcgtgtatatttatctgtttgct
Porc	cagaaactgcagattatgtgtatatttatctgtttatgct
Chèvre	cagaaactgcagatttttgggtatatttatctgtttatgct
poulet	cagaaactggcgggtgtatgtgtatatttatctgtttatgca

zone variable zone conservée



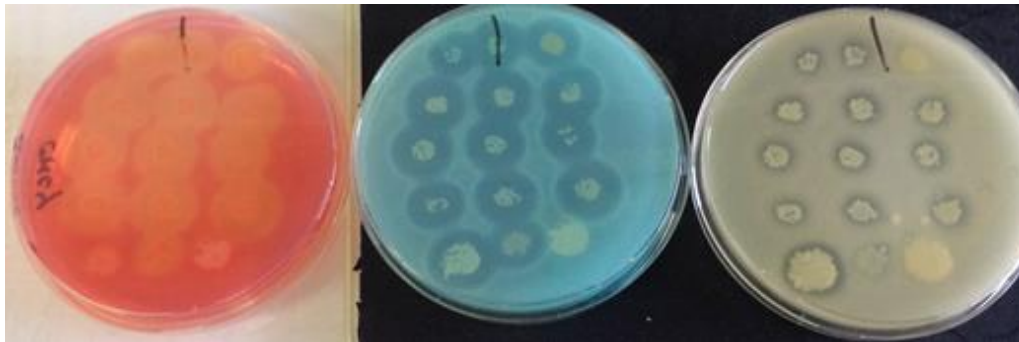
Analyse phénotypique des bactéries isolées à partir des prélèvements



Détection d'enzymes extracellulaires: cellulases, pectinases, protéases

Mobilité: capacité de nage

Utilisation de différents sucres : fructose, mannose, inositol, arabinose, maltose, saccharose, mélibiose ...



Cellulases

Pectinases

Protéases



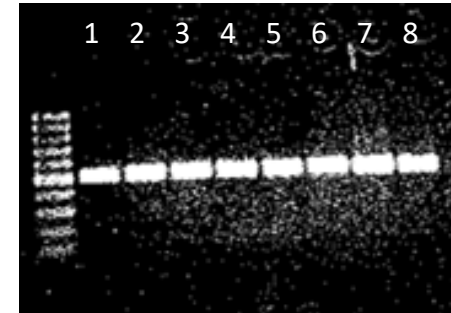
Test de mobilité

→ Donne des informations pour une première classification des bactéries isolées mais ne suffit pas à leur identification.

Analyse moléculaire : PCR et séquençage ADN

PCR (réaction de polymérisation en chaîne)
→ **amplification** d'un fragment d'ADN donné

PCR du gène de l'ARNr 16S → fragment de 1,5 kb

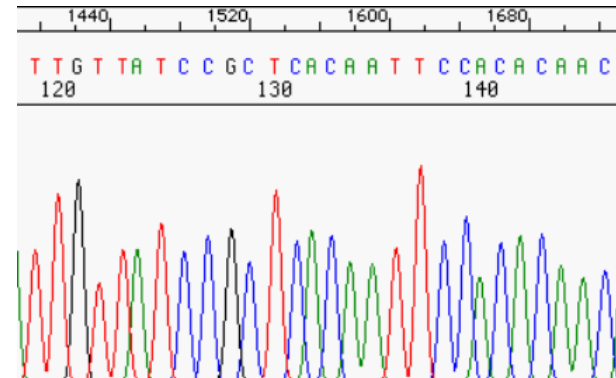


1,5 kb
ARNr 16S

Séquençage ADN du produit de PCR

Comparaison avec les séquences connues
présentes dans des banques de données

→ **identification au niveau genre-espèce**



Bactéries identifiées dans les lésions, carapaces indemnes et eau

Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce	Nombre d'isolats		
					Saines	Lésions	Eau
<i>γ-proteobacteria</i>	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	0	0	1
			<i>Plesiomonas</i>	<i>shigelloides</i>	0	2 (+1)	0
		Erwiniaceae	<i>Erwinia</i>	<i>rhapontici</i>	1	0	0
		Pectobacteriaceae	<i>Pectobacterium</i>	<i>aquaticum, carotovorum</i>	0	0	2
		Yersiniaceae	<i>Rahnella</i>	<i>aceris, variigena, woolbedingensis</i>	1 (+2)	4 (+9)	(+1)
				<i>Serratia</i>	<i>myotis</i>	0	0
	Aeromonadales	Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i>	<i>allosaccharophila, australiensis, cavernicola, veronii</i>	0	4 (+11)	1 (+3)
	Alteromonadales	Shewanellaceae	<i>Shewanella</i>	<i>xiamenensis</i>	0	1	0
	Vibrionales	Vibrionaceae	<i>Vibrio</i>	<i>anguillarum, parilis</i>	0	0	2 (+2)
	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>allii, atacamensis, brassicacearum, capeferrum, fildesensis, kilonensis, kitaguniensis, neuropathica, palleroniana, paracarnis, sp.</i>	8 (+2)	5 (+6)	2 (+2)
	Moraxellales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	<i>lwoffii</i>	1	2 (+2)	0
<i>Bacteroides</i>	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Sphingobacterium</i>	<i>kitahiroshimense</i>	1	0	0

Isolats identifiés par séquence du gène ARNr 16S et, entre parenthèses, par analyse phénotypique

→ Grande diversité des genres et espèces

Arbre phylogénétique

40 souches identifiées par séquence du gène ARNr 16S :

Pseudomonas

Enterobacteriales

Aeromonas

Moraxellaceae

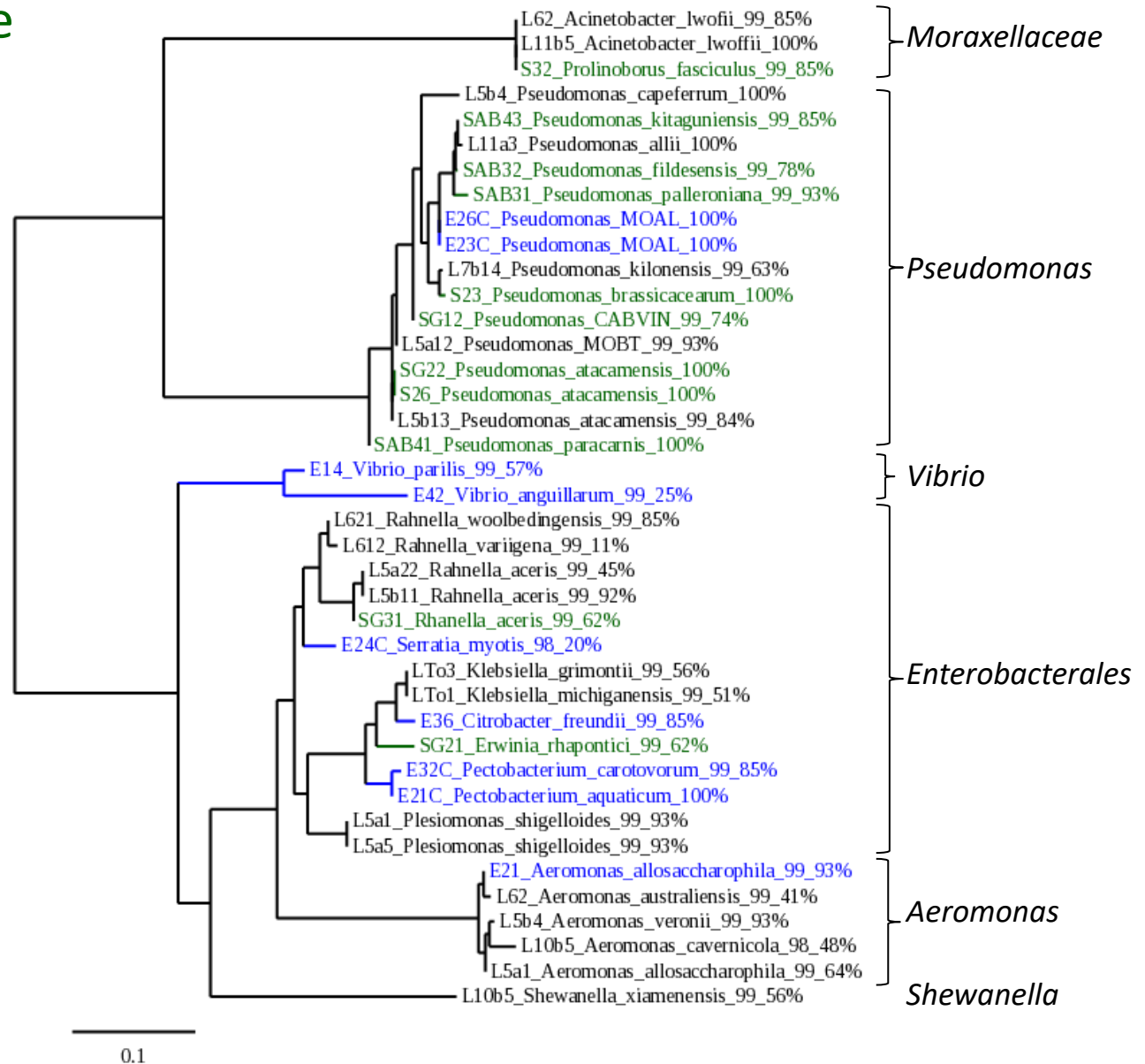
Vibrio

Shewanella

Isolats de l'eau

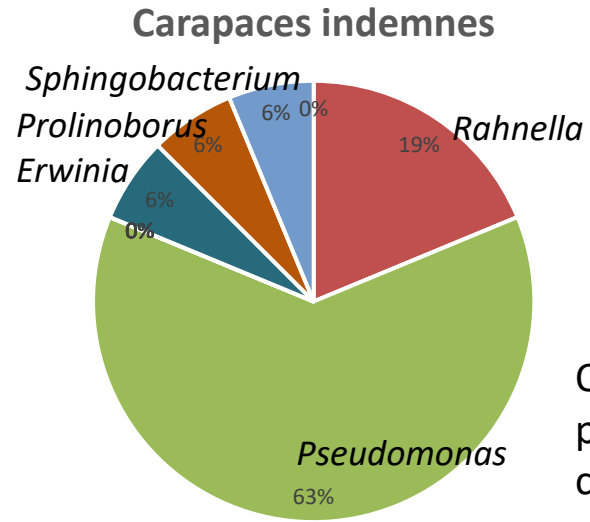
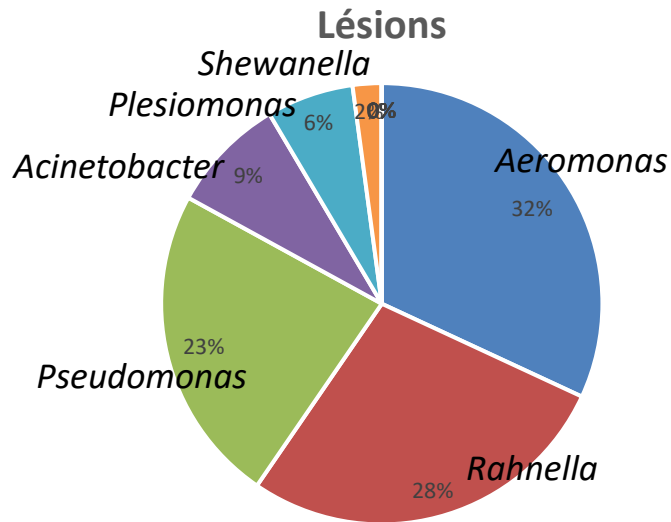
Isolats de carapaces

Isolats de lésions

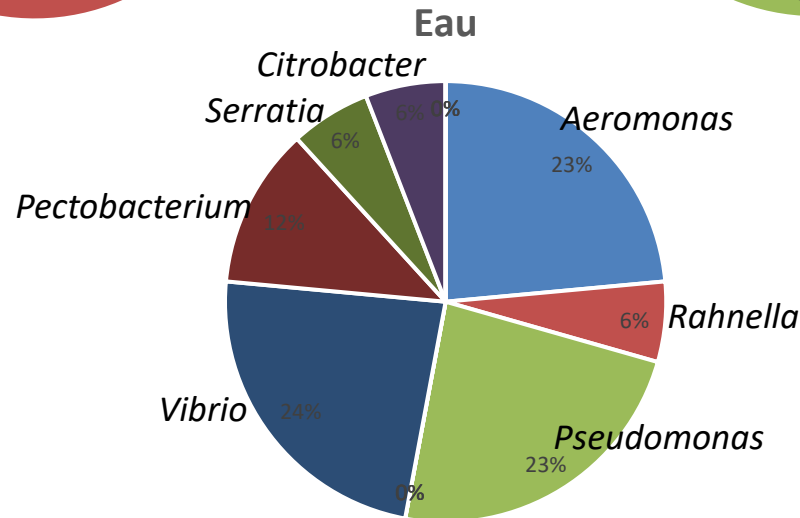


Bactéries identifiées dans les lésions, carapaces indemnes et eau

Proportion pour chaque type de prélèvements



Quantité de bactéries plus faible sur les carapaces saines



Bactéries identifiées dans les lésions, carapaces indemnes et eau

Bilan par genre

Aeromonas: présents seulement dans les lésions et dans l'eau, pas sur les carapaces indemnes

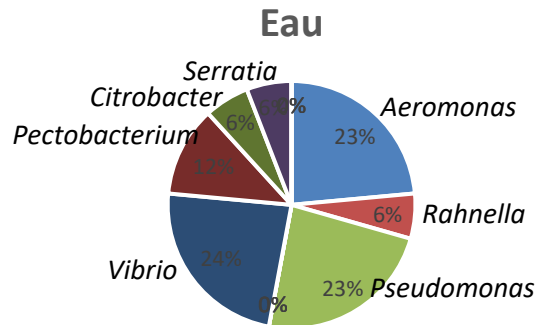
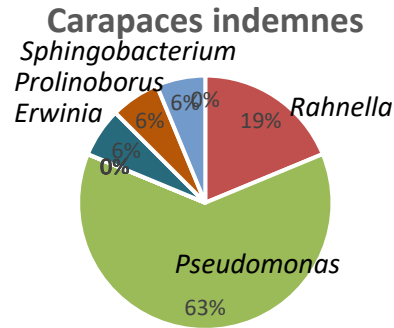
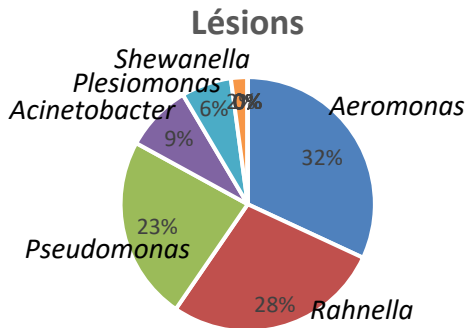
Rahnella: présents dans les 3 types de prélèvements, un peu plus fréquent dans les lésions

Pseudomonas: présents dans les 3 types de prélèvements, majoritaires sur les carapaces indemnes

Acinetobacter, *Plesiomonas* et *Shewanella*: présents seulement dans les lésions mais en faible quantité

Erwinia, *Prolinoborus*, *Sphingobacterium*: présents seulement sur les carapaces indemnes, en faible quantité

Vibrio, *Pectobacterium*, *Citrobacter* et *Serratia* détectés seulement dans l'eau, *Vibrio* en quantité importante



Rôle des protéases bactériennes dans la formation des lésions?

La carapace de la tortue est protégée en surface par des écailles constituées de kératine, une protéine fibreuse et résistante.

Les protéases sécrétées par les bactéries pathogènes sont souvent responsables de dommages directs aux tissus de l'hôte.

9 isolats producteurs de protéases parmi les 40 identifiés (22%)

	Genre espèce	Prélèvement	Protéases
5a3	<i>Vibrio parilis</i>	Eau	xx
7b14	<i>Vibrio anguillarum</i>	Eau	xx
10a1	<i>Aeromonas veronii</i>	Lésion plastron	xx
10b2	<i>Aeromonas cavernicola</i>	Lésion plastron	x
12-6	<i>Aeromonas australiensis</i>	Lésion plastron	x
E1.4	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	Eau	x
E2.1	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	Eau	x
E4.2	<i>Pectobacterium aquaticum</i>	Eau	x
E2-1c	<i>Pseudomonas CABVIM_s</i>	Eau	xf



Parmi les bactéries isolées de lésions, seul *Aeromonas* montre une forte activité protéase

Le genre *Aeromonas*

***Aeromonas*: présents seulement dans les lésions et dans l'eau, pas sur les carapaces indemnes**

Sur-représentation dans les lésions, forte production de protéases.

Ces bactéries ont été isolées de nombreux animaux malades, des insectes à l'homme. Elles sont fréquentes dans les environnements aquatiques et appartiennent à la flore digestive normale des reptiles. Elles ont été associées à des maladies chez les poissons, les grenouilles et les reptiles (Fernández-Bravo et Figueras 2020).

Aeromonas est l'agent le plus courant de septicémies chez les reptiles (Firmin, 1997), il affecte en particulier les chéloniens et les crocodiliens, soit en captivité, soit sauvages (Jacobson, 2007).

Leur potentiel pathogène est multifactoriel, incluant des facteurs de virulence permettant d'adhérer à l'hôte, de l'envahir et de détruire ses tissus. Les protéases sécrétées peuvent causer des dommages directs aux tissus de l'hôte.

Par contre, les infections à *Aeromonas* impliquent souvent plus d'un type de bactéries, ce qui est indicatifs d'infections polymicrobiennes. Ceux-ci sont considérés comme des **agents pathogènes opportunistes**.

→ **Implication possible dans la formation ou le développement des lésions de carapaces des cistudes**

Genres de l'ordre des *Enterobacterales*

***Plesiomonas* : présents seulement dans les lésions, en faible quantité**

Plesiomonas est surtout présent dans les eaux douces chaudes des pays tropicaux, il infecte les animaux marins vivant près des estuaires (poissons, batraciens, crustacés ou coquillages) et peut devenir ainsi pathogène pour l'homme (gastro-entérite).

***Rahnella*: présents dans les 3 types de prélèvements, plus fréquent dans les lésions**

Les espèces de *Rahnella* sont souvent associées aux plantes ou à l'eau et présentes dans la flore intestinale des herbivores, y compris les invertébrés.

Quelques espèces ont été associées à des infections opportunistes chez l'homme.

→ Probablement pas d'implication dans la formation des lésions. Les lésions constitueraient une niche favorable à leur présence

Le genre *Pseudomonas*

Pseudomonas: présents dans les 3 types de prélèvements, majoritaires sur les carapaces indemnes

Une seule espèce isolée produit des protéases

Ce genre comprend plus une soixantaine d'espèces très variées. Ces bactéries sont largement répandues dans l'environnement et se retrouvent plus particulièrement dans les milieux aquatiques.

Elles font partie de la flore commensale des animaux (intestin, peau, bouche, fosses nasales ...).

Quelques espèces jouent un rôle pathogène chez les plantes ou chez l'homme et l'animal. Ces bactéries sont peu agressives mais peuvent se comporter comme **opportunistes** chez des hôtes affaiblis.

Les 10 espèces identifiées dans cette étude ne sont pas décrites comme pathogènes.

→ Pas d'implication dans la formation des lésions.

Membres de la flore bactérienne normale de la carapace ?

Le genre *Vibrio*

***Vibrio* détectés seulement dans l'eau, en quantité importante**

Très forte production de protéases

Extrait de la Thèse de Lilian BIOT, Toulouse 2017. « La dermatite ulcéreuse, autrement appelée « ulcerative shell disease » (USD) est une maladie provoquant des ulcères de la carapace. Cette pathologie est causée par *Beneckeia chitinivora*, une bactérie appartenant à la famille des Vibrionacées, capable de digérer la kératine.

Normalement non pathogène, *Beneckeia chitinivora* peut pénétrer dans l'organisme des tortues à la faveur d'une lésion sur la carapace et entraîner une USD (Wallach, 1975)»

Depuis 1980, « *Beneckeia chitinivora* » est re-nommée *Vibrio parilis*.

Dans notre étude, nous avons isolé *Vibrio parilis* dans l'eau mais pas à partir de lésions.

→ Faible probabilité que ce soit l'agent causal de ces lésions chez *Emys orbicularis*.
Mais *Vibrio parilis* provoque des maladies de la carapace et dégrade la kératine d'après la littérature.

Conclusions de ces études

Différentes espèces de bactéries trouvées à la surface de la carapace par rapport à l'eau environnante

→ les carapaces de cistudes hébergent une **communauté bactérienne diversifiée** qui n'est pas simplement le reflet de la population bactérienne présente dans leur milieu aquatique.

Nombre élevé de bactéries dans les lésions par rapport aux carapaces indemnes.

→ **Zone de confinement** formée par les cavités des lésions, peut faciliter l'adhérence des bactéries car la surface protectrice de la carapace est abimée.

Les prélèvements provenant de lésions montrent des **populations bactériennes hétérogènes**.

→ Cette hétérogénéité suggère que les lésions résultent de **co-infections bactériennes**. Des bactéries opportunistes peuvent cohabiter avec des pathogènes dans ces lésions.

Sur-représentation d'*Aeromonas* dans les lésions, mais ce pathogène opportuniste est-il l'agent causal?

On ne peut exclure que d'autres bactéries présentes dans l'eau, comme ***Vibrio parilis*** (responsable de l'USD d'après la littérature), soient impliquées la phase de primo-infection des carapaces.

Les diverses bactéries présentes dans les lésions pourraient être des **pathogènes opportunistes** (comme ***Aeromonas***) impliqués dans l'extension des lésions ou simplement des bactéries profitant de la niche confinée formée par la lésion (comme ***Rahnella***).

Merci pour votre attention

