



FISH
PASS



SCIMABIO *Interface*
science-management interface for biodiversity conservation

Pôle commun ADNe indicateurs de fonctionnalité écologique



Recherche du parasite *Tetracapsuloides bryosalmonae* et de son hôte *Fredericella sultana* par ADNe et test de l'infection par *T. bryosalmonae* chez les truitelles par ADNu sur le bassin de l'Aa



Campagne d'échantillonnage Septembre 2025

Pôle thématique ADNe SCIMABIO-Interface/Fish-Pass

Valentin Vasselon (SCIMABIO-Interface)

Eloïse Duval (FISH-PASS)



Etablissement public du Ministère chargé du développement durable



Décembre 2025



Les cyclades B
5, rue des Quatre Vents
74200 Thonon-les-Bains
www.scimabio-interface.fr



INGÉNIERIE DES MILIEUX AQUATIQUES
Aquatic environment engineering
18 rue de la Plaine - ZA des 3 prés - 35890 LAILLÉ - France
Tél. 33 (0)2 99 77 32 11
Fax. 33 (0)2 99 77 31 96
www.fish-pass.fr



Rédaction et relecture du rapport :

Eloïse Duval (FishPass) et Valentin Vasselon (SCIMABIO-Interface)

Maître d'ouvrage de l'étude :

Fédération du Pas-de-Calais pour la Pêche et la Protection du Milieu Aquatique (FDAAPPMA62)

Dossier suivi par :

Benoît Rigault

Sommaire

Sommaire	2
1 Contexte et objectifs de l'étude	3
2 Matériel et méthodes	4
2.1 L'ADN environnemental	4
2.1.1 Détection du signal ADNe de <i>T. bryosalmonae</i> et <i>F. sultana</i> dans l'eau de rivière	4
2.1.2 Détection de l'infection chez les poissons par recherche du signal ADNu de <i>T. bryosalmonae</i>	5
2.1.3 Principe général de la dPCR	5
2.1.4 Stratégie et protocole d'échantillonnage	6
3 Analyses	9
3.1 Extraction de l'ADN total	9
3.2 Suivis spécifiques par ddPCR	9
4 Résultats et interprétation	11
4.1 Description des stations et validation de l'échantillonnage	11
4.1.1 Echantillons ADNe	11
4.1.2 Echantillons ADNu	11
4.2 Détection de <i>T. bryosalmonae</i>, <i>F. sultana</i> et <i>S. trutta</i> par ddPCR	13
4.2.1 Validation des données	13
4.2.2 Résultats de détection par ddPCR en ADNe	13
4.2.3 Résultats de détection de <i>T. bryosalmonae</i> en ADNu et statut d'infection des populations	15
5 Conclusions	16
6 Bibliographie	17
7 Fiches terrain	19

1 Contexte et objectifs de l'étude

La maladie rénale proliférative, MRP ou PKD pour proliférative kidney disease en anglais est une maladie infectieuse émergente causée par le parasite myxozoaire *Tetracapsuloides bryosalmonae*. Au cours des deux dernières décennies, de plus en plus d'épidémies de MRP ont été reportées au sein de populations de salmonidés d'Europe et d'Amérique du Nord (Hedrick et al., 1993; Sudhagar et al., 2020). Cette maladie est en effet responsable de pertes importantes en aquaculture et de déclin inquiétants des populations de salmonidés sauvages, avec jusqu'à 95 % de mortalité signalée dans les fermes piscicoles (Okamura et al., 2011). En outre, plusieurs études ont montré que le déclin de la truite fario (*Salmo trutta*) dans les rivières suisses était lié au développement de la MRP (Burkhardt-Holm & Scheurer, 2007; Wahli et al., 2007).

Ce parasite a un cycle de vie complexe et alterne entre deux hôtes : un poisson salmonidé et un bryzoaire, plus particulièrement de l'espèce *Fredericella sultana* (Tops & Okamura, 2005). L'infection chez les poissons peut rester bénigne, mais certains individus développent des symptômes de la maladie, particulièrement lorsque la température de l'eau dépasse les 15°C de façon prolongée, qui peuvent aller de la perte d'efficacité liés à des troubles d'acquisition de l'oxygène, pouvant mener dans les cas les plus sévères à une mort par asphyxie (Bruneaux et al., 2017; Hedrick et al., 1993; Okamura et al., 2011). Les jeunes de l'année sont les plus sensibles au développement de la MRP, et les poissons survivant leur première infection semblent développer une immunité car ils ne redéveloppent pas les symptômes lors d'infections ultérieures (Feist & Longshaw, 2006; Foott & Hedrick, 1987).

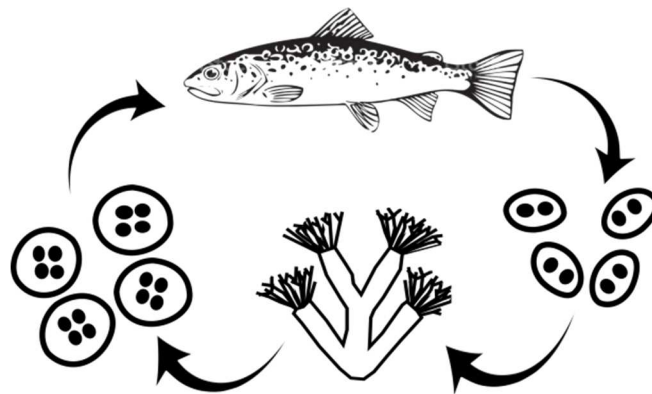


Figure 1 : Cycle parasitaire de *Tetracapsuloides bryosalmonae*. Les spores infectieuses pour les poissons sont émises par les bryozoaires infectés lorsque la température de l'eau atteint 9°C (Gay et al., 2001). Les spores entrent dans leur hôte poisson par la peau et les branchies, circulent dans le sang jusqu'à atteindre les reins. Après multiplication, les spores sont excrétées par les truites infectées et vont pouvoir infecter de nouvelles colonies de bryozoaires (Okamura et al., 2011).

En France, la distribution du parasite et le statut d'infection des populations de salmonidés sauvages restent encore largement méconnus. Le parasite, de par sa taille microscopique et son hôte bryzoaire, de par sa distribution sporadique dans les cours d'eau sont difficilement détectables dans leur environnement. Des outils de détection du parasite et de son hôte bryzoaire par détection d'ADN environnemental ont été développés et utilisés pour cartographier leur présence et estimer leur abondance relative dans les cours d'eau (Carraro et al., 2018; Duval, 2022; Fontes et al., 2017).

Ainsi, la FDAAPPMA62 a réalisé en 2024 une étude de détection de l'ADN environnemental de ces espèces sur 17 stations du bassin versant de l'Aa. Le bryzoaire *F. sultana* avait été détecté sur

l'ensemble des stations, exceptée la Vilaine, et le parasite *T. bryosalmonae* était également détecté sur la grande majorité des stations, sauf pour les stations amont et plus étonnamment sur les 2 stations les plus aval. Suite à ces premières investigations, la FDAAPPMA62 a souhaité connaître le statut d'infection des populations de truites présentes sur l'Aa. Au cours de cette étude, 4 stations ont été échantillonnées, toujours avec la méthode ADNe pour détecter le parasite et le bryzoaire en cours d'eau, mais également en recherchant l'ADN du parasite potentiellement excrété par les urines des poissons (ADNu), afin de pouvoir détecter l'infection par *T. bryosalmonae*.

2 Matériel et méthodes

2.1 L'ADN environnemental

L'ADN environnemental (ADNe) peut être défini comme l'ADN total pouvant être extrait à partir d'un échantillon environnemental (eau, biofilm, sol, air...) sans avoir à isoler au préalable les individus qui vivent dans le milieu (Taberlet et al., 2012). Pour les milieux aquatiques, comme les lacs et les rivières, l'ADNe extrait à partir d'un échantillon d'eau intègre à la fois l'ADN des microorganismes vivant dans l'eau (bactéries, microalgues, champignons...), mais aussi l'ADN libéré par les macroorganismes au contact du milieu sous différentes formes (Figure 2; Pawlowski et al., 2020). En fonction des matrices environnementales échantillonnées (eau, biofilm, sédiment) et des techniques déployées en laboratoire, il est possible de réaliser des inventaires de diversité ou le suivi d'espèces d'intérêt grâce à l'ADN des individus retrouvé dans l'environnement.

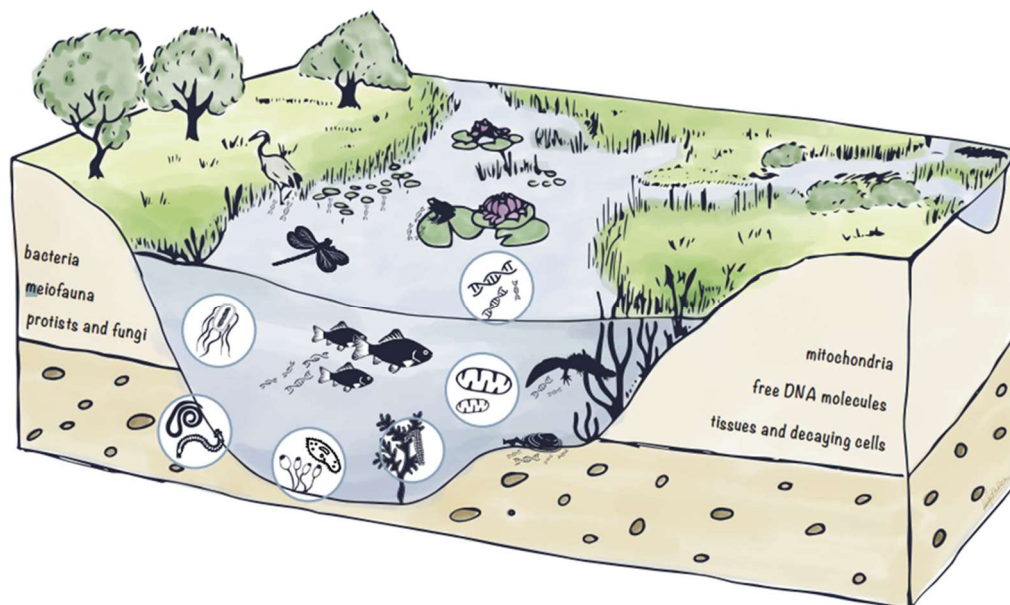


Figure 2 : Origine et forme de l'ADN environnemental dans les milieux aquatiques (Pawlowski et al., 2020)

2.1.1 Détection du signal ADNe de *T. bryosalmonae* et *F. sultana* dans l'eau de rivière

Dans le cadre de cette étude, le signal ADNe que nous pouvons détecter peut provenir directement de spores de *T. bryosalmonae* émises par les poissons infectés via l'urine, par les cellules de bryozoaires porteuses du parasite ou directement par l'intermédiaire de l'ADN des spores présentes dans l'eau. Il est également possible de détecter de l'ADN libre (extracellulaire) provenant de spores dégradées.

Pour ce qui est des bryozoaires et de *F. sultana*, le signal ADN détectable peut provenir de cellules ou fragments de colonies emportés par le courant, mais aussi de statoblastes, spores permettant une reproduction asexuée émises par les colonies sénescents (Hartikainen et al., 2009, 2013; Hartikainen & Okamura, 2015).

En prélevant et en filtrant de l'eau de la rivière, il est possible d'extraire et d'analyser cet ADNe pour détecter et dans une certaine mesure quantifier la présence d'une ou plusieurs espèces cibles comme *T. bryosalmonae* et *F. sultana*.

2.1.2 Détection de l'infection chez les poissons par recherche du signal ADN de *T. bryosalmonae*

En s'appuyant sur le principe de l'excrétion des spores du parasite par les poissons infectés, une méthode de détection non létale de l'infection chez les poissons a été développée (ADNu pour ADN urinaire, Duval et al., 2021) et est utilisée dans cette étude afin de déterminer si les truitelles retrouvées au niveau des stations prélevées en ADNe sont infectées. En utilisant cette méthode à une période propice au relargage des spores par les poissons, les truites infectées relarguent des spores infectieuses pour les bryozoaires, qui permettent au parasite de boucler son cycle et/ou de l'ADN du parasite dans l'eau. Ainsi, maintenant les poissons dans de l'eau non contaminée pendant 30-45min, et en filtrant l'eau ensuite comme pour un échantillonnage ADNe dans l'eau de rivière, la détection de l'ADN du parasite à partir des filtres permet d'attester du statut d'infection des individus testés.

2.1.3 Principe général de la dPCR

Afin de maximiser les chances de détecter les signaux ADNe et ADNu potentiellement relargués par *T. bryosalmonae* et *F. sultana* dans des échantillons environnementaux, potentiellement présents en très faible quantité (taille de l'espèce, distribution sporadique, dilution rapide du signal dans l'eau), l'approche de détection ciblée d'ADN par dPCR (Digital PCR) a été privilégiée.

La dPCR est une technique de biologie moléculaire qui permet de cibler et d'amplifier une région génétique propre à une espèce via l'utilisation d'amorces et de sondes génétiques fluorescentes spécifiques (Doi et al., 2015; Figure 3). A partir d'un échantillon d'ADNe, il est donc possible de détecter et de quantifier par fluorescence le nombre de copies du gène spécifique à l'espèce ciblée. Les nouvelles technologies de dPCR comme la ddPCR QX600 (Droplet Digital PCR, Biorad) offrent même la possibilité de co-détecter en une seule analyse jusqu'à 6 signaux de fluorescence dans un échantillon ADNe, donc jusqu'à 6 espèces distinctes. Cette technologie est parfaitement adaptée à des suivis de cycles parasitaires impliquant plusieurs espèces de groupes biologiques différents, comme c'est le cas pour *T. bryosalmonae* et ses hôtes *F. sultana* et *S. trutta*. Pour les échantillons ADN, la même méthode est employée, pour la détection seule de *T. bryosalmonae*.

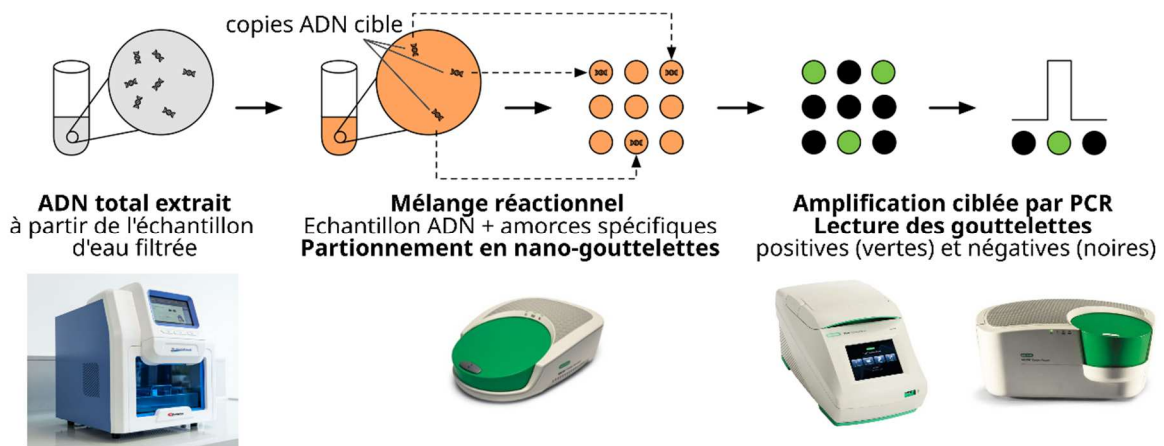


Figure 3. Schéma de fonctionnement de la ddPCR et appareils associés (automate d'extraction, générateur de gouttelettes, thermocycleur et lecteur de gouttelettes), modifié à partir de Mojarro et al. (2017).

2.1.4 Stratégie et protocole d'échantillonnage

Les stations échantillonnées ont été sélectionnées la FDAAPPMA62, avec au total **4 stations** (Figure 4), réparties sur le bassin versant de l'Aa selon les résultats obtenus par détection d'ADNe lors de l'étude 2024. Sur chaque station, les prélèvements d'eau par filtration ont été réalisés en triplicatas pour la détection d'ADNe dans l'eau de rivière du parasite *T. bryosalmonae* et du bryzoaire *F. sultana*, en suivant un protocole d'échantillonnage adapté à partir de Vautier et al. (2021), voir ci-dessous.

Les signaux ADNe émis par le parasite et le bryzoaire semblent être plus important au cours de l'été (Mercier et al., 2025), et les truites fario infectées relarguent des spores infectieuses pour les bryzoaires détectables par ADNe à cette période de l'année via leur urine (Duval et al., 2021; Hedrick et al., 2004), c'est pourquoi l'échantillonnage a été réalisé par la FDAAPPMA62 à la fin de l'été, les 24 et 25 Septembre 2025. Le test de l'infection chez les populations de poissons a été réalisé à partir de la méthode ADNu, adaptée de Duval et al. (2021).

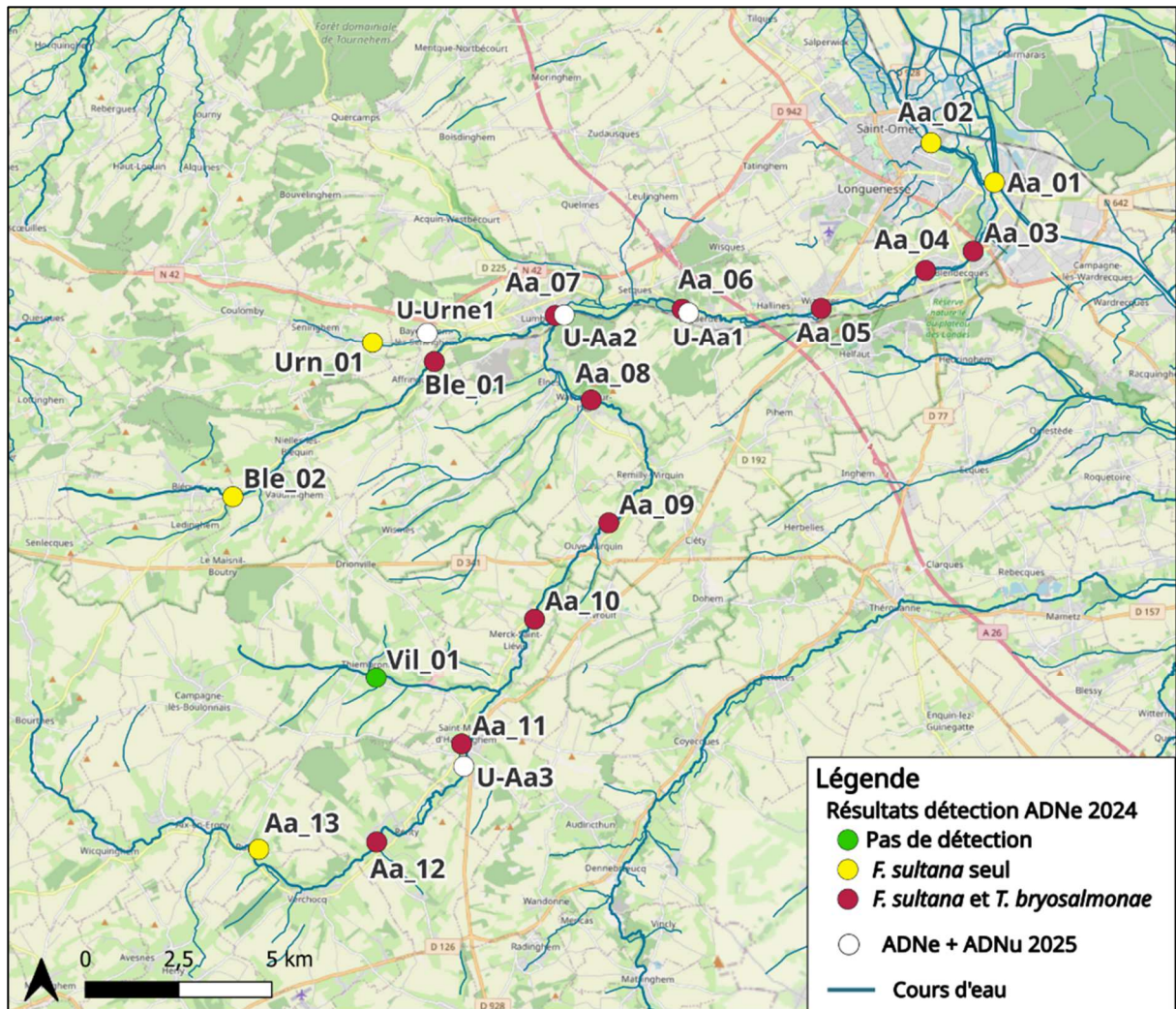


Figure 4. Carte illustrant les 17 sites échantillonnés en 2024 et les 4 sites échantillonnés en 2025 par ADNe et ADNu. Fond de carte : ©OpenStreetMap.

Echantillonnage ADNe

Les prélèvements d'eau filtrée ont été réalisés en triplicatas sur les 4 stations, avant ou à l'amont des opérations de pêche, de la manière suivante (Figure 5) :

- De l'eau est prélevée en bidon décontaminé à 5-20 cm de profondeur sur des zones de radeurs ou en sortie de courant, en plusieurs fois de manière à couvrir la largeur du cours d'eau.
- L'eau est ensuite filtrée à l'aide d'une seringue 60mL sur des capsules Stérivex, jusqu'à ce que la filtration ne soit plus possible à cause du colmatage du filtre (entre 500 et 2000mL environ selon la turbidité de l'eau).
- Une fois la filtration terminée, l'eau résiduelle est expulsée du « Sterivex » en faisant une chasse d'air avec la seringue, puis 2 mL de solution de préservation sont ajoutés à l'échantillon filtré pour le préserver (Vautier et al., 2021). Les échantillons sont ensuite maintenus à température ambiante puis conservés à 4°C à leur arrivée au laboratoire jusqu'à extraction de l'ADN.



Figure 5. Illustration des étapes de prélèvement, de filtration et de préservation des échantillons d'eau filtrés (capsule Sterivex).

Sur chaque station, des sondes ont été utilisées pour mesurer la température de l'eau, les concentration et saturation en oxygène, le pH ainsi que la conductivité. Des fiches terrain relatant les conditions dans lesquelles les prélèvements ont eu lieu ont également été remplies.

Echantillonnage ADN

Sur les 4 stations échantillonnées, une pêche électrique a été réalisée par la FDAAPMA62 afin de capturer 20 truitelles correspondant aux cohortes 0+ (ou 1+). Les juvéniles de l'année sont en effet ceux dont le statut d'infection reflète la pression d'infection au cours de l'année du prélèvement, les adultes pouvant avoir été infectés au cours des années précédentes. Il s'agit par ailleurs du stade le plus sensible à l'infection.

Afin de limiter les coûts liés aux analyses et le temps passé sur chaque station, les poissons sont répartis en 5 pools de 4 individus dans des volumes d'eau de source du commerce (8L), qui ont été au préalable mis à température dans le cours d'eau à l'arrivée sur site et pendant l'opération de pêche. En fin de pêche, les bouteilles d'eau de source de 8L sont récupérées et installées dans des glacières. L'utilisation des glacières permet de maintenir une température fraîche et relativement constante tout le long de la stabulation des poissons, ainsi qu'un maintien à l'obscurité pour limiter le stress. Les poissons sont ensuite rincés et disposés dans les bouteilles par lots de 4 individus. La stabulation dure entre 30 et 45min pour s'assurer qu'un cycle d'excrétion ait lieu, et le temps passé est noté pour chaque pool.

A l'issue de la stabulation, l'eau de chaque bidon est filtrée à l'aide d'un filtre sylphium. Ces capsules fonctionnent selon le même principe que les capsules Sterivex, avec une filtration manuelle à l'aide d'une seringue 60mL, mais avec une porosité de filtre plus élevée (0,8µm), qui permet d'éviter un colmatage rapide dû au mucus des poissons. L'eau de chaque bouteille est transvasée dans un bidon propre, et est filtrée à partir de la capsule sylphium (Figure 6).



Figure 6. Illustration de la stabulation d'un pool de poissons dans l'eau de source, et filtration de l'eau sur capsule Sylphium.

Les individus sont pesés afin de pouvoir corriger la quantité d'ADN de parasite détecté et obtenir une quantité excrétée par masse d'individus.

3 Analyses

3.1 Extraction de l'ADN total

Les extractions d'ADN environnemental à partir des capsules Sterivex (ADNe) et Sylphium (ADNu) ont été réalisées avec le kit d'extraction « NucleoMag Water » (Macherey-Nagel) dont le protocole a été adapté aux échantillons d'eau filtrée. La qualité et la quantité d'ADN total ont ensuite été mesurées au spectrophotomètre NanoDrop™ One/OneC (ThermoFisher).

3.2 Suivis spécifiques par ddPCR

Les analyses ddPCR ont été réalisées grâce au QX600 Droplet Digital PCR System (Biorad). Afin de valider le protocole d'échantillonnage, le signal ADNe de *T. bryosalmonae* et *F. sultana* est comparé avec celui d'une espèce repère dont la présence est connue sur la majorité des sites échantillonnés (contrôle positif), c'est pourquoi une co-détection de la truite fario (*Salmo trutta*) a été réalisée. Les signaux ADNe de 3 cibles ont ainsi été co-détectés avec des amorces et sondes fluorescentes spécifiques de :

- *T. bryosalmonae* : myxozoaire, parasite responsable de la PKD chez les salmonidés (prélèvements ADNe et ADNu, 3 marqueurs différents)
- *F. sultana* : bryzoaire, hôte de *T. bryosalmonae* pour les prélèvements ADNe
- *S. trutta* : truite fario, hôte de *T. bryosalmonae*, et témoin environnemental pour les prélèvements ADNe

Le logiciel QuantaSoft™ Analysis Pro Software (Bio-rad) a ensuite été utilisé pour visualiser et analyser les données de ddPCR pour les signaux *T. bryosalmonae*, *F. sultana* et *S. trutta* (Figure 7). Les résultats bruts par échantillon correspondent à un nombre de gouttelettes fluorescentes dites positives pour chaque espèce ramené à un nombre total de gouttelette générée pour l'échantillon. Grâce à ces informations, un nombre de copie de gène de l'espèce ciblée est déterminé par μL d'extrait ADN puis converti en nombre de copies par litre d'eau filtrée, puis divisé par le temps d'excrétion et la masse total des individus du pool pour les échantillons ADN.

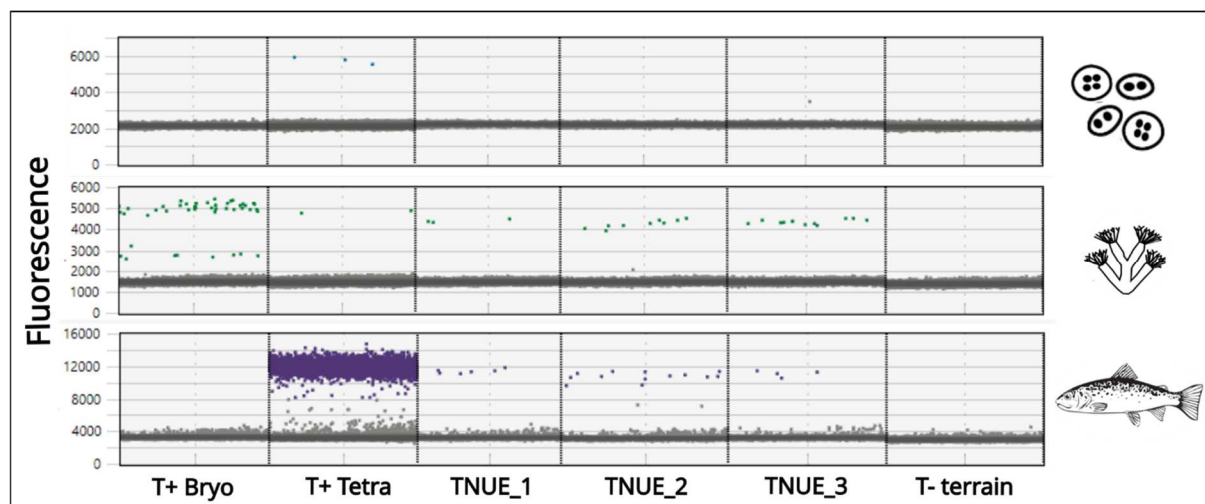


Figure 7 : Illustration des résultats ddPCR sur le logiciel : en bleu clair les gouttelettes positives pour la détection de *T. bryosalmonae* (présentes uniquement sur le témoin positif), en vert les gouttelettes positives pour la détection de *F. sultana*, en violet les gouttelettes positives pour la détection de *S. trutta*, et en gris les gouttelettes négatives (niveau de fluorescence basal pour chaque canal). Les deux premiers échantillons sont des témoins positifs (tissu de bryzoaire et échantillon environnemental positif aux 3 espèces), les trois suivants des échantillons environnementaux, et un témoin de terrain négatif.

Des témoins négatifs d'extraction et de ddPCR ont été intégrés aux analyses afin d'évaluer des contaminations potentielles introduites par l'opérateur ainsi que la présence de contaminations croisées entre échantillons. Les témoins positifs et négatifs ont permis de définir un signal de fluorescence dit basal pour permettre la validation des détections positives (Figure 7).

Pour chaque station, la stabilité du signal ADNe a été évaluée en comparant les résultats des 3 répliques, puis les 3 résultats ont été moyennés. Les résultats sont rendus en nombre de copie de gène de la cible par μL de réaction par L d'eau filtrée.

4 Résultats et interprétation

4.1 Description des stations et validation de l'échantillonnage

4.1.1 Echantillons ADNe

Table 1. Description des stations au point de prélèvement ADNe

Station	Cours d'eau	Localisation	Date et heure de prélèvement	Température de l'eau (°C)	Conductivité (µS/cm)	O ₂ (mg/L)	Saturation O ₂ (%)	pH	Volume filtré par échantillon (mL)	
U-Aa1	Aa	Esquerdes	25/09/2025	10,8	611	11,7	104	8,28	A	1080
									B	1080
									C	1140
U-Aa2	Aa	Lumbres	25/09/2025 13:50	11,4	604	12,8	116	8,00	A	1020
									B	1020
									C	1020
U-Aa3	Aa	Fauquembergues	24/09/2025 13:40	11,9	600	13,4	123	8,28	A	960
									B	1020
									C	1020
U-Urne1	Urne à l'eau	Bayenghem-lès-Seninghem	24/09/2025 09:40	11,4	601	12,2	110	8,16	A	960
									B	960
									C	960

Les prélèvements ont été réalisés par la FDAAPMA62 les 24 et 25 Septembre 2025. Les conditions d'écoulement sur les différentes stations ont permis les prélèvements et filtrations d'eau pour la recherche d'ADNe dans de bonnes conditions. L'ensemble des informations récoltées sur les fiches terrain est disponible en fin de rapport.

Les volumes filtrés sont stables entre les 3 répliques de chaque station, et également entre stations (Table 1). Les volumes moyens totaux filtrés par station sont compris entre 2880 et 3300mL, volumes jugés suffisants pour la quantification de l'ADNe.

4.1.2 Echantillons ADN_u

Les poissons ont stabiulé en moyenne 48min (entre 36 et 70min), durées permettant la réalisation d'au moins un cycle d'excrétion par les poissons (Curtis & Wood, 1991), et les masses de truitelles par pools étaient comprises entre 25 et 108g (pool 4 de la station Aa2 ; moyenne du total des pools 50g, Table 2).

Table 2. Caractéristiques des pools d'individus, utilisées pour corriger la quantité d'ADN de parasite excrétée.

Station	Pool	Durée de stabulation (min)	Masse totale de poissons (g)
U-Aa1	1	45	37
	2	45	44
	3	45	53
	4	46	57
	5	47	49
U-Aa2	1	45	81
	2	43	75
	3	43	59
	4	42	108
	5	41	75
U-Aa3	1	65	44
	2	70	43
	3	67	28
	4	64	31
	5	64	32
U-Urne1	1	40	31
	2	41	36
	3	39	25
	4	37	43
	5	36	45

La courbe de la taille en fonction de la masse suggère que la majorité des individus prélevés étaient des 0+, avec potentiellement deux classes d'âge échantillonnées sur la station U-Aa2 (0+ et 1+ pour les individus de taille supérieure à 130mm), les caractéristiques des individus étant plus homogènes sur les autres stations. Parmi les individus appartenant potentiellement à la cohorte 1+, 3 étaient dans le pool 4 de la station U-Aa2.

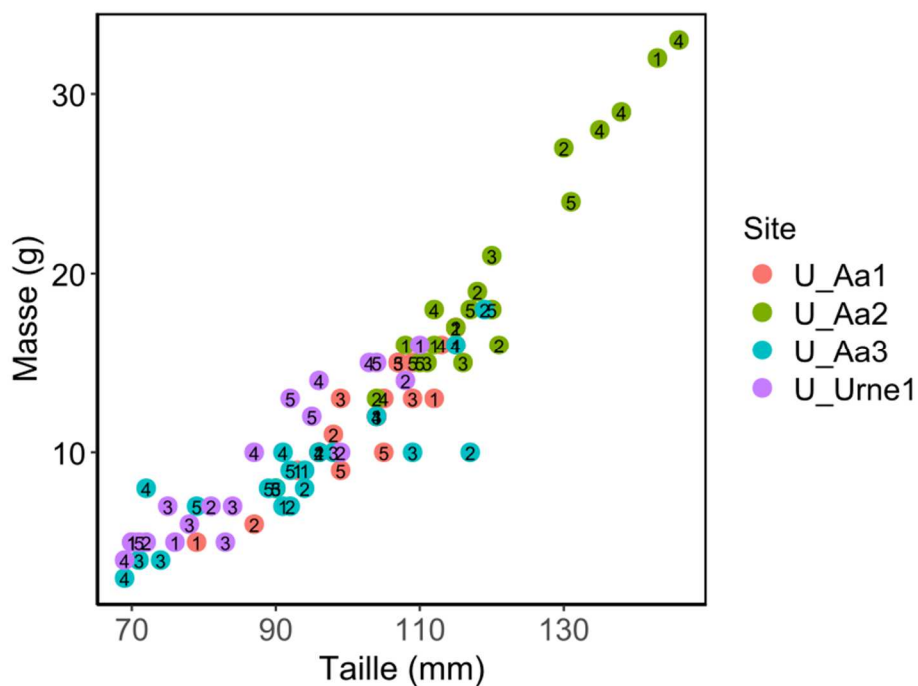


Figure 8. Taille des poissons échantillonnés en fonction de leur masse. La couleur indique le site d'origine, et le numéro le pool d'individus testé.

4.2 Détection de *T. bryosalmonae*, *F. sultana* et *S. trutta* par ddPCR

4.2.1 Validation des données

Un contrôle qualité des runs de ddPCR a été réalisé pour s'assurer qu'un nombre suffisant de gouttelettes soit obtenu pour chaque station (>10 000) et ainsi permettre une profondeur d'analyse suffisante. Lorsque ce nombre n'était pas atteint, les échantillons concernés sont réanalysés jusqu'à l'obtention d'un nombre suffisant de gouttelettes.

Les témoins positifs constitués d'extrait ADN de tissu du bryozoaire *F. sultana*, et d'un échantillon environnemental connu déjà connu pour être positif à *T. bryosalmonae* et *S. trutta* sont bien sorti positifs en ddPCR avec les amorces et sondes génétiques spécifiques aux espèces recherchées, ce qui valide la qualité des expériences de ddPCR réalisées.

Les témoins négatifs de terrain, d'extraction et de ddPCR ont tous donné des résultats négatifs pour la détection de *T. bryosalmonae*, *F. sultana* et *S. trutta* comme illustré sur la Figure 7. Aucune contamination des échantillons n'a ainsi pu être mise en évidence.

L'ensemble de ces contrôles qualité étant conformes, l'analyse des résultats obtenus en ddPCR pour les échantillons ADNe a pu être réalisée.

4.2.2 Résultats de détection par ddPCR en ADNe

Les résultats moyennés des répliques de terrain de chaque station sont présentés dans la Table 3, et le nombre de répliques positifs est également indiqué.

*Table 3 : Résultats de l'amplification ciblée de l'ADN de *S. trutta*, *F. sultana* et *T. bryosalmonae* en nombre de copies d'ADN détectées par litre d'eau filtrée. Le nombre de répliques de terrain positifs est également reporté.*

Code site	<i>T. bryosalmonae</i> 1		<i>T. bryosalmonae</i> 2		<i>T. bryosalmonae</i> 3		<i>F. sultana</i>		<i>S. trutta</i>	
	Copies d'ADN*	Replicas positifs	Copies d'ADN*	Replicas positifs	Copies d'ADN*	Replicas positifs	Copies d'ADN*	Replicas positifs	Copies d'ADN*	Replicas positifs
U-Aa1	0	0/3	1,87E+02	1/3	1,92E+02	2/3	7,02E+03	3/3	5,68E+03	3/3
U-Aa2	1,83E+02	2/3	5,62E+02	3/3	6,90E+02	2/3	6,83E+03	3/3	3,91E+03	3/3
U-Aa3	0	0/3	1,09E+03	2/3	8,03E+02	2/3	5,52E+03	3/3	7,98E+03	3/3
U-Urne1	2,25E+03	3/3	2,48E+04	3/3	6,78E+03	3/3	7,71E+03	3/3	1,42E+04	3/3

*Les résultats sont présentés en nombre de copies d'ADN cible par litre d'eau filtrée

- Signal ADNe Truite fario *Salmo trutta* (témoin environnemental)

L'ADN de la truite fario a été détecté en quantité conséquente sur l'ensemble des stations et des répliques de terrain (Table 3, Figure 9). Ce témoin environnemental permet, en plus des témoins positifs et négatifs, de valider l'échantillonnage et l'efficacité de la détection du signal ADNe au cours de cette étude. La station de l'Urne à l'eau présente un signal légèrement plus important.

- Signal ADNe Bryozoaire *Fredericella sultana*

Le signal ADNe du bryozoaire *F. sultana* a été détecté sur toutes les stations échantillonnées et l'ensemble des répliques de terrain (Table 3, Figure 9). Ces signaux, très stables sur toutes les stations,

indiquent que des colonies de *F. sultana* sont présentes tout le long du linéaire étudié, confirmant les détections obtenues en 2024.

➤ Signal ADNe Myxozoaire *Tetracapsuloides bryosalmonae*

Le signal ADNe de *T. bryosalmonae* a été détecté sur les 4 stations prospectées. Il est rare d'obtenir des signaux positifs pour l'ensemble des réplicas de terrain prélevés pour cette espèce, c'est pourquoi trois marqueurs situés sur des régions génétiques différentes ont été utilisés pour cette espèce afin de maximiser la sensibilité de sa détection. Dans cette étude, le marqueur 1 semble moins sensible que les marqueurs 2 et 3, qui eux sont complémentaires (Table 3, Figure 11). Aucun signal n'avait été détecté un peu plus en amont sur l'Urne en 2024, alors que la station U-Urne1 échantillonnée en 2025 est celle qui présente les signaux ADNe du myxozoaire les plus importants.

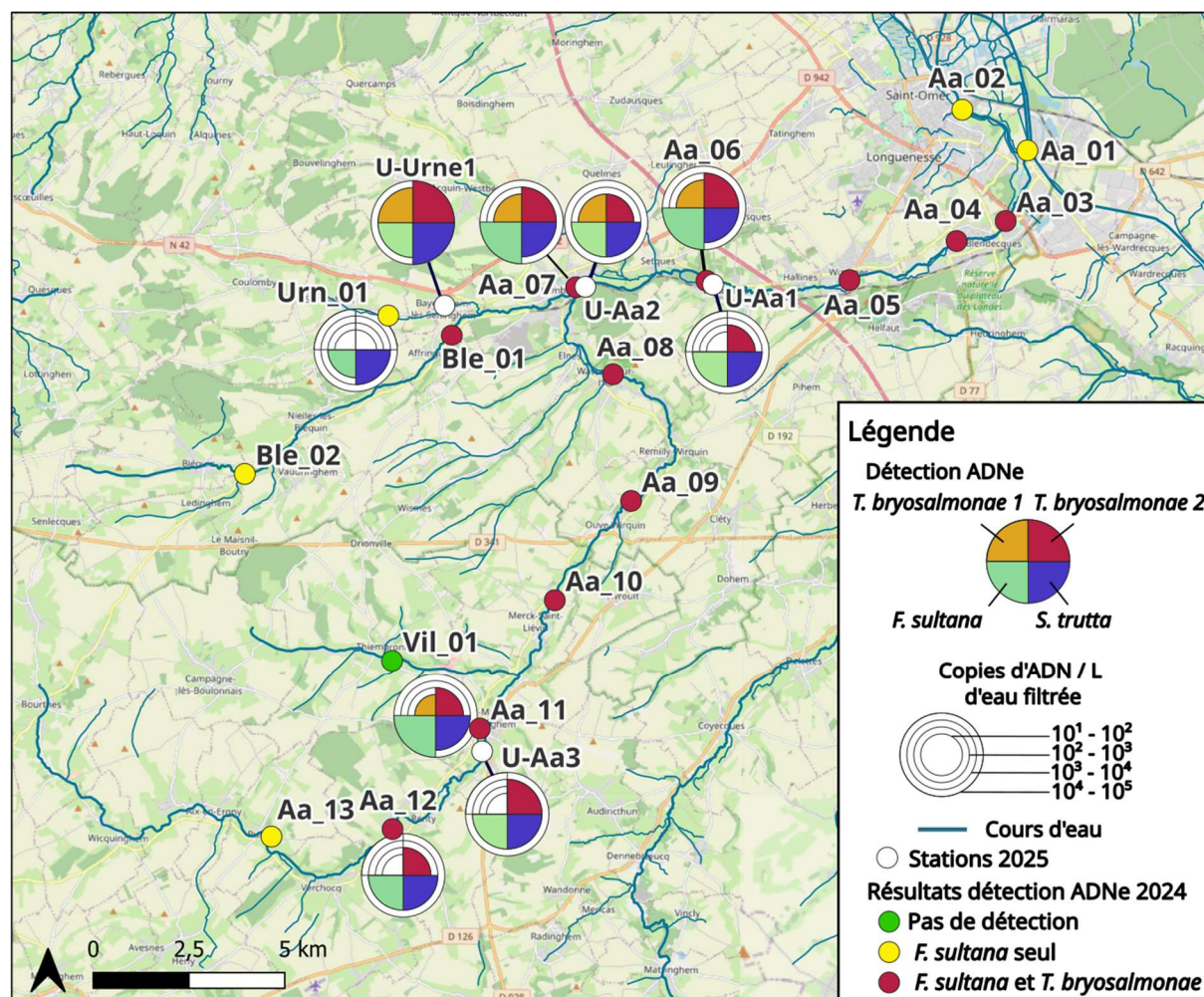


Figure 9. Cartographie de la distribution de la truite fario *Salmo trutta*, du bryozoaire *Fredericella sultana* et du parasite *Tetracapsuloides bryosalmonae* selon leur détection par recherche d'ADNe en ddPCR sur les 4 stations échantillonnées en 2025. Chaque quart de cercle correspond à une espèce, et sa taille correspond à l'ampleur de la concentration d'ADNe détectée (échelle logarithmique). La présence de *T. bryosalmonae* a été recherchée à l'aide de deux marqueurs différents pour augmenter la sensibilité de l'analyse. Les résultats obtenus lors de la campagne 2024 sont également présentés en présence/absence de détection et en quantitatif pour les stations situées à proximité de l'échantillonnage 2025. Fond de carte : ©OpenStreetMap.

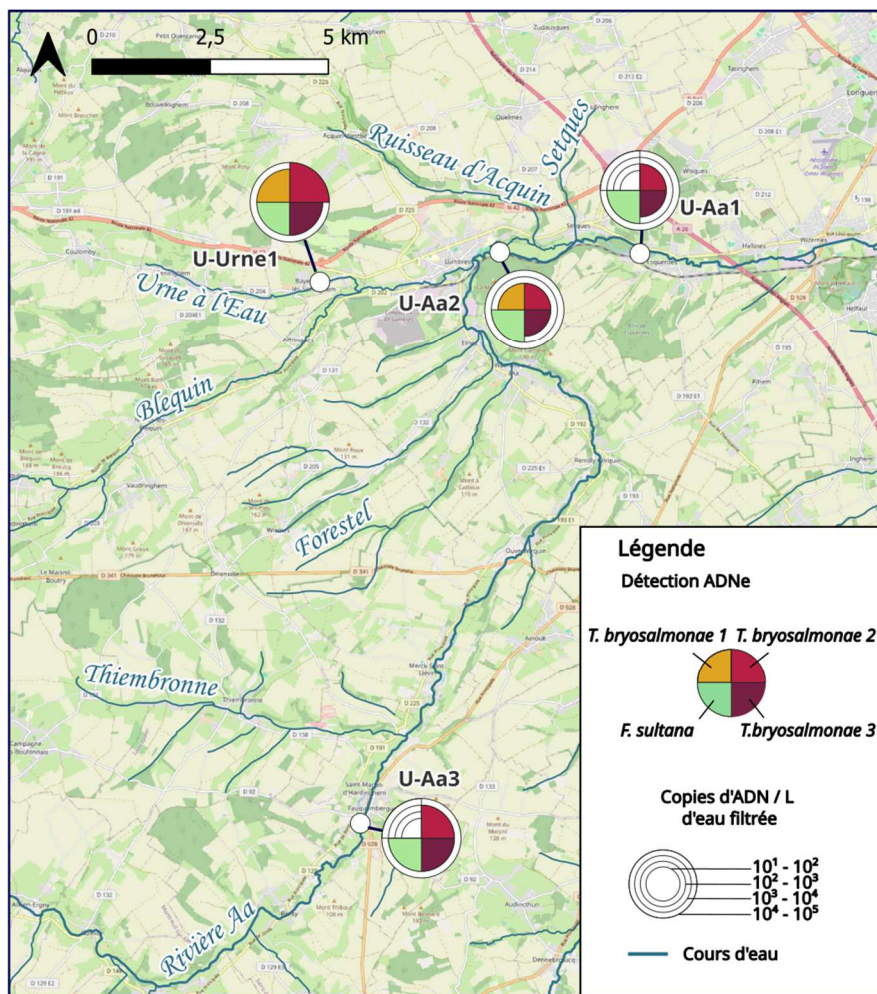


Figure 10. Représentation cartographique des résultats, identique à la Figure 9 pour les stations échantillonnées en 2025 avec ajout du marqueur 3. L'ajout de ce 3ème marqueur ne change pas l'interprétation des résultats.

4.2.3 Résultats de détection de *T. bryosalmonae* en ADNu et statut d'infection des populations

Tout comme pour les analyses ADNe, les échantillons ADNu correspondant aux pools d'individus testés ont été analysés avec les 3 marqueurs pour la détection de *T. bryosalmonae* (Figure 11). Des signaux ADNu ont été détectés pour tous les pools d'individus, sauf pour le pool 2 de la station U-Aa2, et des signaux très faibles ont été obtenus pour le pool 2 de la station U-Aa3 (0,1 copie/L/min/g avec les marqueurs 1 et 2 seulement). Le marqueur 1 semble toujours moins sensible que les marqueurs 2 et 3, qui eux donnent des résultats similaires (sauf exception sur les pools 3 de la station U-Aa1 où la détection est plus faible avec le marqueur 2 et 2 de la station U-Aa3).

Ces résultats indiquent une prévalence d'infection non nulle sur les 4 stations échantillonnées, avec à minima 20% d'infection chez les individus testés pour la station U-Aa2 (4 pools donc au moins 4/20 individus infectés), et 25% pour les autres stations (5/20 individus). Les quantités excrétées par le pool 4 de la station U-Urne1 sont plus élevées que pour les autres pools, toutes stations confondues. Les quantités d'ADN excrétées ne peuvent pas être liées directement à une intensité d'infection dans les reins des poissons, mais la forte quantité d'ADN excrétée pourrait traduire une quantité de spores de parasite émises par les poissons dans la rivière, infectieuses pour les bryozoaires plus importante

(Duval et al., 2021). Les plus fortes quantités d'ADN excrétées par les poissons de l'Urne rejoignent les plus fortes quantités d'ADNe du parasite détectées dans l'eau de rivière sur cette station (Table 3 , Figure 9).

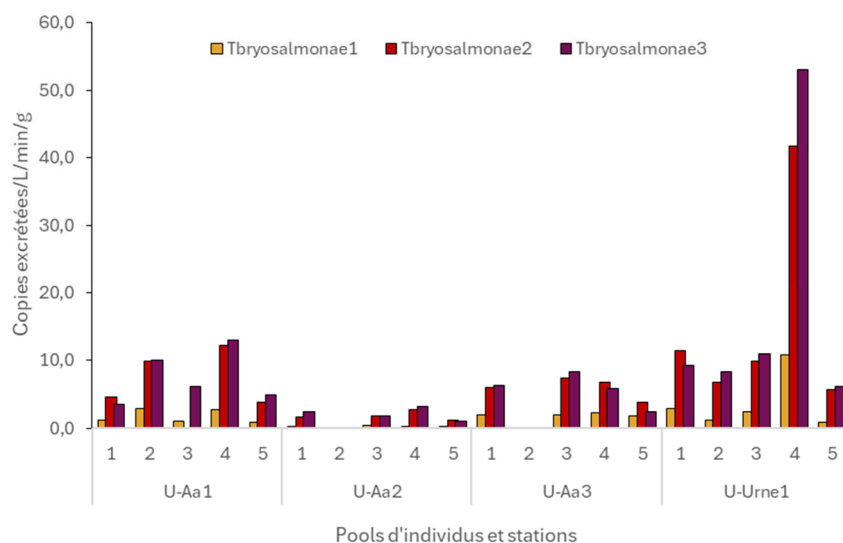


Figure 11. Détection de l'infection par *T. bryosalmonae* chez les poissons par la méthode ADNu.

L'observation des poissons à partir des photographies prises sur le terrain (voir fiches terrain ci-dessous), bien que subjective et compliquée par le ventre des poissons légèrement aplati sur l'ichtyomètre, laisse penser que certains individus pourraient présenter des signes externes de gonflement et/ou exophtalmie, caractéristiques des symptômes de la PKD (ex. U-Aa1 pool5 ind5, U-Aa3 pool4 ind2, et une part importante des individus échantillonnés sur l'Urne, comme pool1 ind1, pool2 ind2 et pool3 ind1).

5 Conclusions

Cette étude confirme que le bryzoaire *F. sultana*, hôte principal du parasite *T. bryosalmonae* responsable de la PKD des salmonidés est présent sur l'ensemble du réseau hydrographique étudié, tout comme le parasite myxozoaire *T. bryosalmonae*, retrouvé également sur l'Urne où il n'avait pas été détecté sur une station plus en amont en 2024.

Le test d'infection par détection d'ADNu, dérivé de l'excrétion des truitelles qui stabulent dans de l'eau non contaminée, indique que des poissons sont infectés sur les 4 stations échantillonnées, avec potentiellement un peu moins d'excrétion sur les stations U-Aa2 et U-Aa3.

Le test d'infection ADNu confirme ainsi que les populations de truite fario du système Aa sont susceptibles de développer la maladie rénale proliférative (infection avec symptômes et risque de mortalité) si les conditions environnementales favorables à son développement se présentent (notamment plusieurs jours consécutifs avec une température >15°C au cours de la période estivale). Certains individus échantillonnés présentent des signes de gonflement, qui pourraient être dus au développement de la maladie. Cependant, il est fort probable que les individus les plus malades n'auraient potentiellement pas ou peu survécu à la période estivale, les pics de température ayant eu lieu en amont de la campagne d'échantillonnage. La PKD pourrait également se développer chez la truite arc-en-ciel et l'ombre commun, espèces contactées lors des pêches sur le secteur étudié, bien que ce dernier soit potentiellement moins sensible à l'infection (Ros et al., 2022). De nouvelles études sur le statut d'infection des poissons sont envisagées par la FDAAPPMA62 sur d'autres bassins.

6 Bibliographie

Bruneaux, M., Visse, M., Gross, R., Pukk, L., Saks, L., & Vasemägi, A. (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), Article 1. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12701>

Burkhardt-Holm, P., & Scheurer, K. (2007). Application of the weight-of-evidence approach to assess the decline of brown trout (*Salmo trutta*) in Swiss rivers. *Aquatic Sciences*, 69(1), Article 1. <https://doi.org/10.1007/s00027-006-0841-6>

Carraro, L., Hartikainen, H., Jokela, J., Bertuzzo, E., & Rinaldo, A. (2018). Estimating species distribution and abundance in river networks using environmental DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201813843. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813843115>

Curtis, B. J., & Wood, C. M. (1991). The function of the urinary bladder *in vivo* in the freshwater rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, 155, 567-583.

Doi, H., Uchii, K., Takahara, T., Matsushashi, S., Yamanaka, H., & Minamoto, T. (2015). Use of Droplet Digital PCR for Estimation of Fish Abundance and Biomass in Environmental DNA Surveys. *PLOS ONE*, 10(3), Article 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122763>

Duval, E. (2022). *Detection, distribution, and impacts of the emerging parasite Tetracapsuloides bryosalmonae on wild populations of the brown trout Salmo trutta* [Thèse de doctorat, 239p]. Université Toulouse III Paul Sabatier.

Duval, E., Blanchet, S., Quéméré, E., Jacquin, L., Veyssièrre, C., Lautraite, A., Garmendia, L., Yotte, A., Parthuisot, N., Côte, J., & Loot, G. (2021). Urine DNA (uDNA) as a non-lethal method for endoparasite biomonitoring : Development and validation. *Environmental DNA*, edn3.228. <https://doi.org/10.1002/edn3.228>

Feist, S. W., & Longshaw, M. (2006). Phylum Myxozoa. In P. T. K. Woo, *Fish diseases and disorders* (CAB International, p. 230-296).

Fontes, I., Hartikainen, H., Holland, J., Secombes, C., & Okamura, B. (2017). *Tetracapsuloides bryosalmonae* abundance in river water. *Diseases of Aquatic Organisms*, 124(2), Article 2. <https://doi.org/10.3354/dao03116>

Foott, J. S., & Hedrick, R. P. (1987). Seasonal occurrence of the infectious stage of proliferative kidney disease (PKD) and resistance of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to reinfection. *Journal of Fish Biology*, 30(4), Article 4. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1987.tb05771.x>

Gay, M., Okamura, B., & de Kinkelin, P. (2001). Evidence that infectious stages of *Tetracapsula bryosalmonae* for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* are present throughout the year. *Diseases of Aquatic Organisms*, 46, 31-40. <https://doi.org/10.3354/dao046031>

Hartikainen, H., Fontes, I., & Okamura, B. (2013). Parasitism and phenotypic change in colonial hosts. *Parasitology*, 140(11), Article 11. <https://doi.org/10.1017/S0031182013000899>

Hartikainen, H., Johnes, P., Moncrieff, C., & Okamura, B. (2009). Bryozoan populations reflect nutrient enrichment and productivity gradients in rivers. *Freshwater Biology*, 54(11), Article 11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02262.x>

Hartikainen, H., & Okamura, B. (2015). Ecology and Evolution of Malacosporean-Bryozoan Interactions. In B. Okamura, A. Gruhl, & J. L. Bartholomew, *Myxozoan Evolution, Ecology and Development* (Springer International Publishing, p. 201-216).

Hedrick, R. P., Baxa, D. V., De Kinkelin, P., & Okamura, B. (2004). Malacosporean-like spores in urine of rainbow trout react with antibody and DNA probes to *Tetracapsuloides bryosalmonae*. *Parasitology Research*, 92(1), Article 1. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0986-3>

Hedrick, R. P., MacConnell, E., & de Kinkelin, P. (1993). Proliferative kidney disease of salmonid fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 3, 277-290. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(93\)90039-E](https://doi.org/10.1016/0959-8030(93)90039-E)

Mercier, C., Duval, E., Lefort, M., Blanchet, S., Veyssiere, C., & Loot, G. (2025). Temporal Dynamics of a Fish Parasite (*Tetracapsuloides bryosalmonae*) and Its Two Main Hosts in Pyrenean Streams : An Environmental DNA -Based Approach. *Environmental DNA*, 7(3), e70127. <https://doi.org/10.1002/edn3.70127>

Mojarro, A., Hachey, J., Bailey, R., Brown, M., & Doeblner, R. (2017, mars 21). *Nucleic Acid Extraction and Sequencing from Low-Biomass Synthetic Mars Analog Soils*. Lunar & Planetary Science XLVIII, Woodlands, Texas.

Okamura, B., Hartikainen, H., Schmidt-Posthaus, H., & Wahli, T. (2011). Life cycle complexity, environmental change and the emerging status of salmonid proliferative kidney disease. *Freshwater Biology*, 56(4), Article 4. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2010.02465.x>

Pawlowski, J., Apothéloz-Perret-Gentil, L., & Altermatt, F. (2020). Environmental DNA : What's behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring. *Molecular Ecology*, 29(22), Article 22. <https://doi.org/10.1111/mec.15643>

Sudhagar, A., Kumar, G., & El-Matbouli, M. (2020). The Malacosporean Myxozoan Parasite *Tetracapsuloides bryosalmonae* : A Threat to Wild Salmonids. *Pathogens*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010016>

Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA : ENVIRONMENTAL DNA. *Molecular Ecology*, 21(8), Article 8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>


Tops, S., & Okamura, B. (2005). Malacosporean parasites (Myxozoa, Malacosporea) of freshwater bryozoans (Bryozoa, Phylactolaemata) : A review. *Denisia 16, Zugleich Kataloge Der OÖ. Landesmuseen Neue Serie*, 28, Article 28.

Vautier, M., Chardon, C., & Domaizon, I. (2021). *Fish eDNA : Water sampling and filtration through Sterivex filter unit* [Preprint]. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.br5rm856>

Wahli, T., Bernet, D., Steiner, P. A., & Schmidt-Posthaus, H. (2007). Geographic distribution of *Tetracapsuloides bryosalmonae* infected fish in Swiss rivers : An update. *Aquatic Sciences*, 69(1), Article 1. <https://doi.org/10.1007/s00027-006-0843-4>

7 Fiches terrain

Fiche station U-Aa1			
Désignation station			
Cours d'eau	Aa	Commune	Esquerdes / aval passerelle bras gauche
Date et heure prélèvement	25/09/2025 09:40	Météo	nuageux
Structure	FD62		
Description du point de prélèvement			
Facès d'écoulement	lotique	Largeur mouillée (m)	15
Vitesse estimée (cm/s)	25-75	Hauteur d'eau (cm)	15
Limpidité	légèrement colorée	Coloration	#REF!
Colmatage	fort	Ombrage	fermé
Volume total filtré (mL)	3300	Nombre d'échantillons	3
Mesures physico-chimiques			
Température eau (°C)	10,8	Conductivité (µS)	611
Concentration O ₂ (mg/L)	11,70	Saturation O ₂ (%)	104,00
pH	8,28		
Remarques			
autres sp contactées en pêche: ANG, CHA, OBR			





Fiche station U-Aa2

Désignation station

Cours d'eau	Aa	Commune	Lumbres / marais de Lumbres
Date et heure prélèvement	25/09/2025 13:50	Météo	nuageux
Structure	FD62		

Description du point de prélèvement

Faciès d'écoulement	lotique	Largeur mouillée (m)	18
Vitesse estimée (cm/s)	25-75	Hauteur d'eau (cm)	40
Limpidité	moyenne	Coloration	légèrement colorée
Colmatage	fort	Ombrage	semi-ouvert
Volume total filtré (mL)	3060	Nombre d'échantillons	3

Mesures physico-chimiques

Température eau (°C)	11,4	Conductivité (µS)	604
Concentration O ₂ (mg/L)	12,75	Saturation O ₂ (%)	116,00
pH	8,00		

Remarques

autres sp contactées en pêche: ANG, CHA, VAI, LPP





Fiche station U-Aa3

Désignation station

Cours d'eau	Aa	Commune	Fauquembergues / 10m amont pont rue de Rietz-Vilain
Date et heure prélèvement	24/09/2025 13:40	Météo	nuageux
Structure	FD62		

Description du point de prélèvement

Faciès d'écoulement	lotique	Largeur mouillée (m)	9
Vitesse estimée (cm/s)	25-75	Hauteur d'eau (cm)	15
Limpidité	forte	Coloration	légèrement colorée
Colmatage	fort	Ombage	fermé
Volume total filtré (mL)	3000	Nombre d'échantillons	3

Mesures physico-chimiques

Température eau (°C)	11,9	Conductivité (µS)	600
Concentration O ₂ (mg/L)	13,40	Saturation O ₂ (%)	123,00
pH	8,28		
Remarques			

autres sp contactées en pêche: CHA, ANG, LPP, TAC





Fiche station U-Urne1

Désignation station

Cours d'eau	Urne à l'eau	Commune	Bayenghem-lès-Seninghem
Date et heure prélèvement	24/09/2025 09:40	Météo	nuageux
Structure	FD62		

Description du point de prélèvement

Faciès d'écoulement	lotique	Largeur mouillée (m)	4
Vitesse estimée (cm/s)	25-75	Hauteur d'eau (cm)	20
Limpidité	forte	Coloration	légèrement colorée
Colmatage	fort	Ombrage	semi-ouvert
Volume total filtré (mL)	2880	Nombre d'échantillons	3

Mesures physico-chimiques

Température eau (°C)	11,4	Conductivité (µS)	601
Concentration O ₂ (mg/L)	12,20	Saturation O ₂ (%)	110,00
pH	8,16		

Remarques

autres sp contactées en pêche: CHA, ANG



