

Mise au point d'une méthode de détection non létale du nématode *Anguillicola crassus*, parasite de l'anguille européenne *Anguilla anguilla*



LAUNEY Sophie et al.

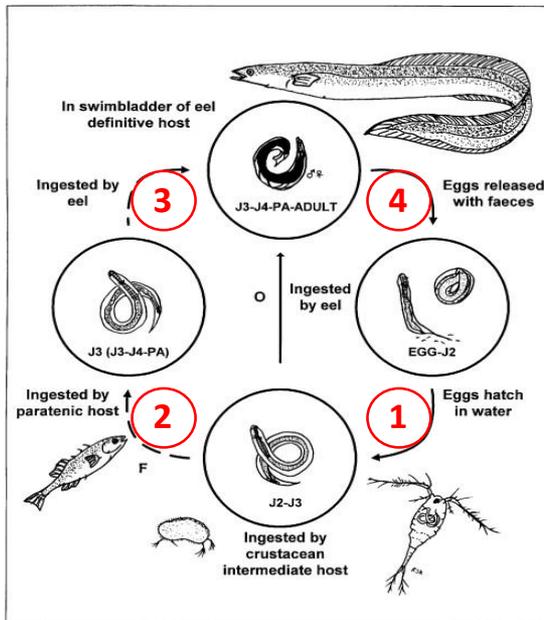
12 06 2019



**AGENCE FRANÇAISE
POUR LA BIODIVERSITÉ**
ÉTABLISSEMENT PUBLIC DE L'ÉTAT

Pôle R&D pour la gestion des migrateurs amphihalins dans leur environnement

- Le nématode, *Anguillicola crassus* :
 - un parasite invasif de l'anguille
 - colonisant les vessies natatoires
 - affecte les performances de déplacement et de migration/reproduction de l'anguille



① et ② les larves d'*A. crassus* attendent au stade larvaire d'être ingérés par des hôtes intermédiaires (copépodes, ostracodes, poissons...)

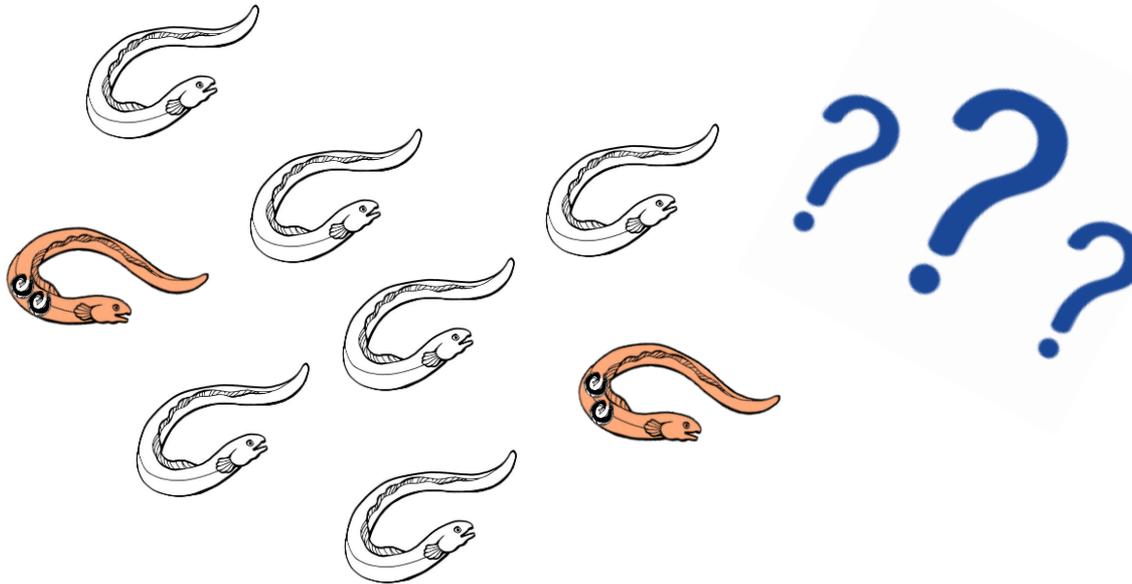
③ Ingestion par l'anguille, rejoint la cavité abdominale et se fixe à la vessie natatoire puis maturation sexuelle

④ passage des œufs et des larves dans le tube digestif et expulsion dans le milieu aquatique avec la matière fécale

Le cycle de vie de *A. crassus*, d'après Kirk (2003)

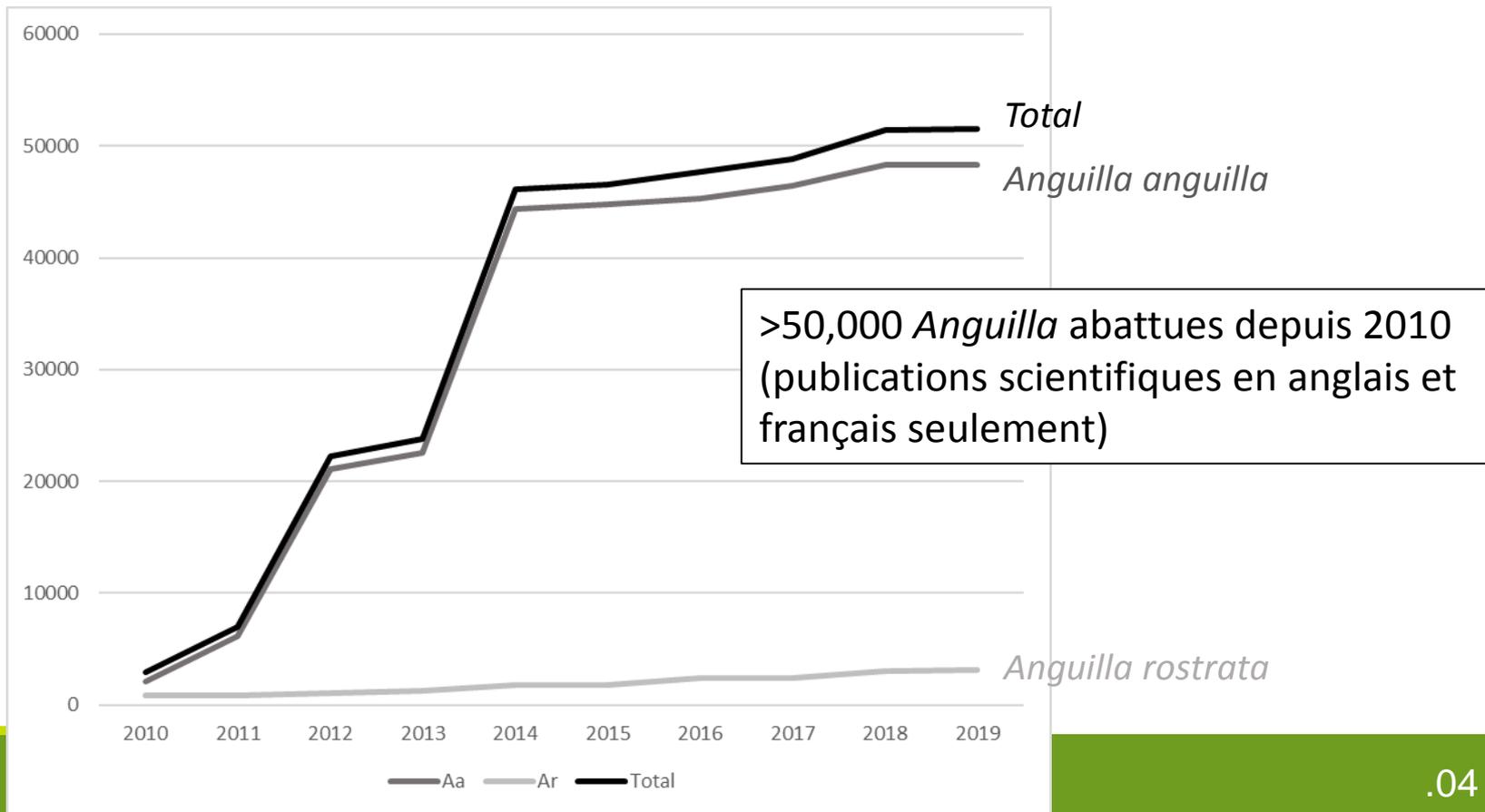
Situation actuelle :

- Prévalence parfois importante dans certaines populations
- Détection du parasite par abattage de l'individu et observation de la vessie natatoire



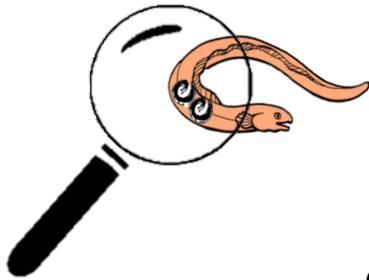
Situation actuelle :

- Prévalence parfois importante dans certaines populations
- Détection du parasite par abattage de l'individu et observation de la vessie natatoire



Situation actuelle :

- Prévalence parfois importante dans certaines populations
- Détection du parasite par abattage de l'individu et observation de la vessie natatoire



Objectifs de l'étude :

- Mise au point d'un protocole non létale de détection à partir des fèces
- Utilisation d'outils moléculaire pour rechercher l'ADN du parasite
- Estimation de la prévalence du nématode sur différents sites de France

1. Echantillonnage

Récupération des fèces sur des sites aux taux variables d'infestation



- **Avril 2017 (2 cours d'eau) :**
 - l'Oir (affluent de la Sélune, Manche)
 - ⇒ Infestation ++
 - ⇒ n=14
 - le Frémur (Côtes d'Armor)
 - ⇒ Infestation +++
 - ⇒ n=15
- **Mai 2018 (2 lagunes) :**
 - Leucate (Pyrénées Orientales)
 - ⇒ Infestation +
 - ⇒ n=10
 - Mauguio (Hérault)
 - ⇒ Infestation ++
 - ⇒ n=12

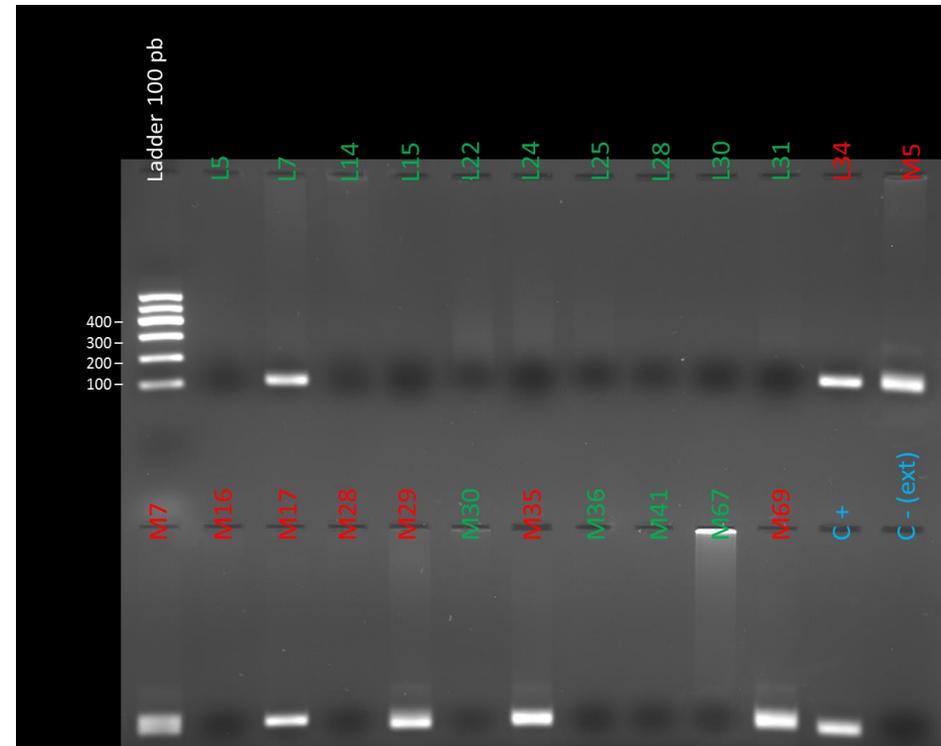
1. Echantillonnage

- Anesthésie des animaux, récupération des féces par massage abdominal
- Après euthanasie, dissection et recherche de parasites (œufs, larves et adultes) dans la vessie par inspection visuelle pour comparaison des deux méthodes

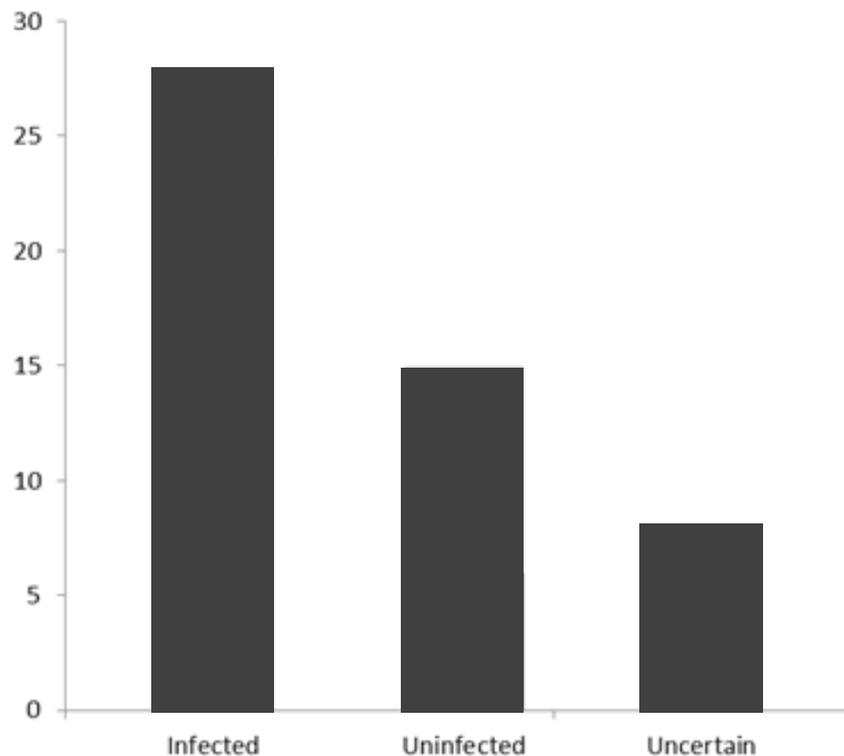


2. Biologie moléculaire

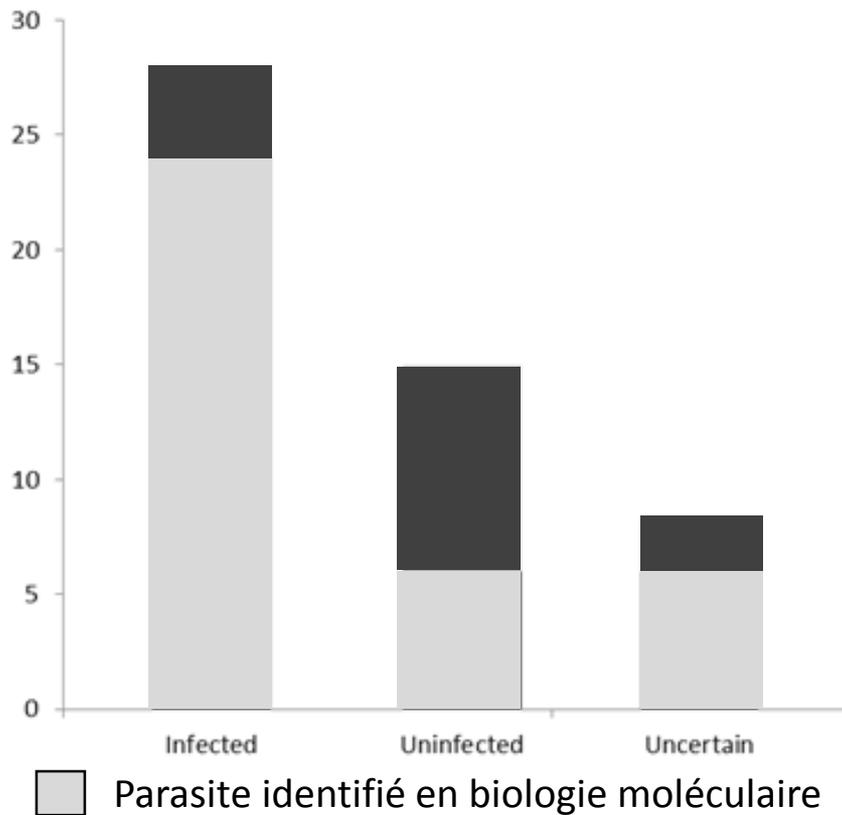
- Double extraction ADN → Permet d'augmenter la quantité d'ADN extrait
- Amplification ciblée (PCR) de trois marqueurs moléculaires spécifiques d'*A. crassus*
- Dans cette étude, on considère que le parasite est présent lorsque au moins 1 sur les 3 marqueurs est amplifié



Gel d'agarose 2%, marqueur *AcrCT-27* (72-200 bp)

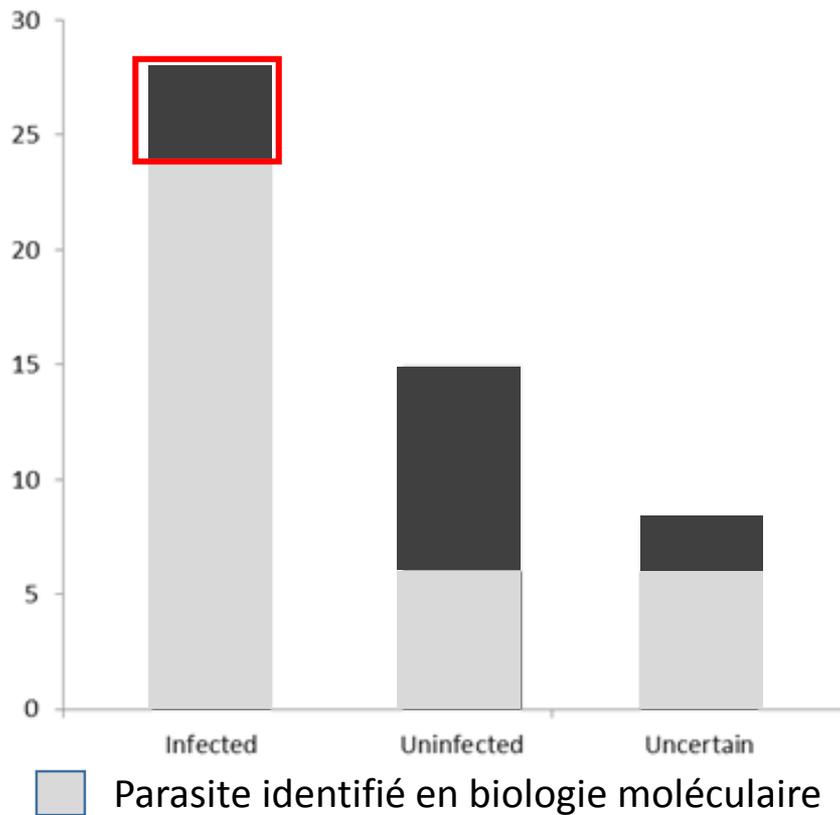


- Observation des vessies natatoires sur 51 anguilles tous sites confondus:
 - 28 infestées
 - 15 non infestées
 - 8 incertaines (pas de parasite mais formes/colorations anormale pouvant s'expliquer par une infestation passée)
- **55% / 71% d'anguilles infestées**



- Observation des vessies natatoires sur 51 anguilles tous sites confondus:
 - 28 infestées
 - 15 non infestées
 - 8 incertaines (pas de parasite mais formes/colorations anormale pouvant s'expliquer par une infestation passée)
→ **55% / 71% d'anguilles infestées**
- Biologie moléculaire : ADN du parasite identifié dans les fèces de
 - 86% des anguilles infestées
 - 37,5% des anguilles non infestées
 - 75% des anguilles « incertaines »
→ **71% d'anguilles infestées**

→ **Cohérence entre les deux méthodes dans 35 cas sur 51 (69%)**

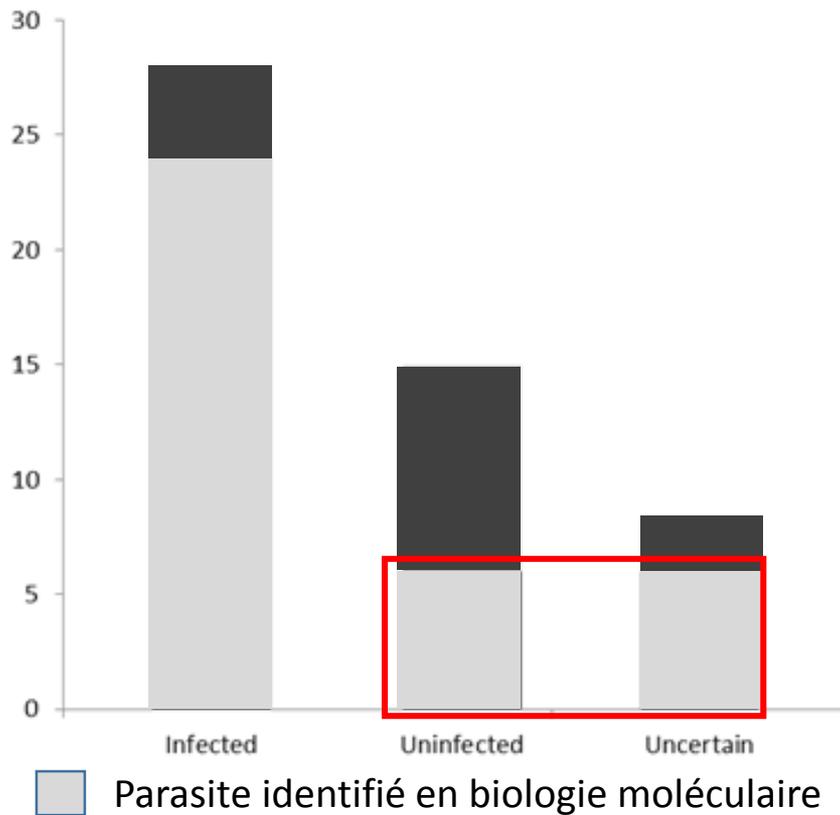


- Pas d'identification de l'ADN du parasite dans des individus infestés (4 cas sur 28)

- ADN dégradé
- 3/4 cas à Leucate et Mauguio où les animaux passent la nuit dans des filets

→ Collecte des fèces le plus tôt possible

→ Possibilité d'ajouter des marqueurs moléculaires



- Présence de l'ADN du parasite pour des individus où le parasite est absent (12 cas sur 23)
 - Contamination croisée des échantillons
→ Précautions lors des prélèvements
 - Traces d'ADN encore présent dans les cas « incertains » (forme nécrotique du parasite)
 - Présence d'hôtes intermédiaires porteurs du parasite dans le tube digestif (crustacés, petits poissons...)

→ L'outil moléculaire apporte des informations complémentaires dans le temps et/ou dans l'espace (traces d'infection passée, présence du parasite dans le milieu...)

- Prévalence variable selon les sites, avec les deux méthodes

Prévalence du parasite	Oir (n=14)	Frémur (n=15)	Leucate (n=10)	Mauguio (n=12)
Observation visuelle : Individu infesté	79%	47%	20%	67%
Observation visuelle : individu incertain	7%	20%	10%	25%
Détection moléculaire : présence de l'ADN du parasite	79%	87%	40%	67%

→ Une méthode non létale est possible pour la détection de *A. crassus* à partir des fèces de l'anguille

- Un protocole combinant trois différents marqueurs semble efficace
- ADN dégradé et en faible quantité : nécessité d'une double extraction d'ADN
- Protocole réalisable par des plateformes de génotypage
- Le prélèvement des fèces doit se faire le plus tôt possible après la sortie de l'eau

Pas 100% congruent avec observation visuelle mais:

- **Permet d'identifier au moins 86% des individus infestés**
- **Permet d'identifier des infestations passées**
- **Permet de comparer des sites en terme d'abondance du parasite dans le milieu**



Thibaut JOUSSEAUME
Anne-Laure BESNARD
Jean-Marc ROUSSEL



Laurent BEAULATON

Anthony ACOU



Agnès BARDONNET



Julien TREMBLAY
Gaëtan POTTIER



Eric FEUNTEUN



Elisabeth FALIEUX
Elsa AMIHAT



Virgile MAZEL
Fabien CHARRIER